

**Titre:** Evaluation du danger écotoxicologique associé à l'utilisation de phanerochaete chrysosporium pour la biorestauration d'un sol contaminé aux HAP  
**Title:**

**Auteur:** Katia Santini  
**Author:**

**Date:** 1998

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Santini, K. (1998). Evaluation du danger écotoxicologique associé à l'utilisation de phanerochaete chrysosporium pour la biorestauration d'un sol contaminé aux HAP [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
**Citation:** <https://publications.polymtl.ca/6845/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/6845/>  
**PolyPublie URL:**

**Directeurs de  
recherche:**  
**Advisors:**

**Programme:** Unspecified  
**Program:**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉVALUATION DU DANGER ÉCOTOXICOLOGIQUE ASSOCIÉ À L'UTILISATION  
DE *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* POUR LA BIORESTAURATION D'UN  
SOL CONTAMINÉ AUX HAP

KATIA SANTINI  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)  
JUILLET 1998



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*Our file    Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-37463-7

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉVALUATION DU DANGER ÉCOTOXICOLOGIQUE ASSOCIÉ À L'UTILISATION  
DE *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* POUR LA BIORESTAURATION D'UN  
SOL CONTAMINÉ AUX HAP

présenté par : SANTINI Katia

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. PERRIER Michel, Ph.D., président

M. SAMSON Réjean, Ph.D., membre et directeur de recherche

Mme. DESCHÊNES Louise, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

Mme. RENOUX Agnès, Ph.D., membre externe

- *Qui vous a appris tout cela, docteur ?*

*La réponse vint immédiatement.*

- *La misère.*

Albert Camus, *La Peste*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le professeur Réjean Samson, mon directeur de recherche, pour ses nombreux conseils et son aide financière, et ma codirectrice le docteur Louise Deschênes pour le support qu'elle m'a accordé au cours de ces deux années.

Je voudrais également remercier Jacques Bureau pour sa supervision, sa disponibilité et son enthousiasme durant la réalisation de la partie expérimentale de mon projet et pour ses nombreux conseils lors de la rédaction du mémoire.

Je voudrais également remercier tout particulièrement Manon Leduc qui m'a apporté une aide considérable. Sa patience, son expertise et sa bonne humeur ont su faire passer les heures en minutes. Merci aussi à toutes les autres personnes qui m'ont aidée au cours de l'expérimentation dont Sandra Estrela, Geneviève Martineau, Valérie Beacart, Marie-Julie Gravel et Pierre Gagné.

Merci à tous pour les encouragements qui m'ont appris à relativiser ...

## RÉSUMÉ

L'effet d'une bioaugmentation par *P. chrysosporium* et d'une biostimulation sur la détoxification d'un sol contaminé aux HAP a été évalué à l'aide d'un suivi biologique et chimique. L'hypothèse de recherche a été basée sur le fait que l'action des micro-organismes sur les contaminants de masse molaire élevée conduirait à l'augmentation de la toxicité du sol par la production de métabolites plus toxiques que les contaminants initiaux. Des essais de toxicité utilisés en cours de traitement s'avéreraient donc des outils pertinents pour l'évaluation de la détoxification du sol.

La mise en place d'une méthodologie de préparation de l'inoculum a tout d'abord été réalisée. La sélection de la méthodologie a été basée sur trois principaux aspects : le choix du principe d'inoculation du sol, la sélection de la base solide utilisée comme support pour la croissance de *P. chrysosporium* et le choix de la solution nutritive optimale à ajouter à la base solide. Ainsi, suite à la croissance du champignon sur gélose, son transfert à la base solide a été réalisé par le biais d'une solution de spores de concentration connue (spectrophotométrie). Le bran de scie a été sélectionné comme support pour la croissance puisqu'il est facile à manipuler, disponible et économique. Pour choisir la solution nutritive optimale une étude comparative a été réalisée. La comparaison qualitative de la propagation du champignon en présence des solutions de glucose (10,08 g/L), d'amidon (10,08 g/L), d'azote (1,58 g/L), de phosphate (4,53 g/L) et d'un milieu nutritif favorisant la croissance de *P. chrysosporium* (C/N/P : 10,08/1,58/0,2 g/L) a montré qu'en présence d'azote, la propagation du champignon a été favorisée. L'ajout d'une solution nutritive à base d'azote a donc amélioré la croissance du champignon sur le bran de scie utilisé.

Afin d'évaluer l'effet de la bioaugmentation de l'inoculum préparé, une première étude a été réalisée à l'aide d'essais de minéralisation pour évaluer la dégradation complète du

contaminant (production de CO<sub>2</sub>). Une seconde étude a permis d'effectuer un suivi de la concentration résiduelle du contaminant dans le sol. Pour ce faire, un sol a été artificiellement contaminé avec du phénanthrène de façon à atteindre une concentration de 100 mg/kg. Une fraction du sol a été bioaugmentée avec l'inoculum en présence de nutriments et une autre fraction a été biostimulée à l'aide de nutriments et/ou bran de scie. Une minéralisation de 55 % a été atteinte pour tous les traitements étudiés, et ce après 50 jours d'incubation. La disparition du phénanthrène, évaluée par analyse chimique, était de près de 100 % après 50 jours de traitement. Le phénanthrène n'a donc pas été complètement minéralisé. La présence de *P. chrysosporium* a apporté un effet transitoire négatif à la minéralisation et à la disparition du phénanthrène. En effet, le temps de latence était de 10 jours pour les traitements sans champignon alors qu'il était de 13 jours dans le sol bioaugmenté. Après 14 jours, la concentration résiduelle en phénanthrène était de 35 mg/kg dans le traitement sans champignon alors qu'elle était de 70 mg/kg dans le sol bioaugmenté. La bioaugmentation n'a donc pas amélioré la minéralisation et la biodégradation du phénanthrène dans le sol artificiellement contaminé par rapport aux valeurs obtenues par les micro-organismes indigènes du sol.

En vue d'évaluer l'effet de la bioaugmentation et de la biostimulation sur la détoxification du sol et d'identifier le rôle des principales composantes, cinq traitements ont été réalisés sur un sol contaminé par des résidus âgés de HAP. Le premier traitement était composé d'un sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur un support de bran de scie (10 % v/v) et nutriments); le deuxième d'un sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur un support de bran de scie (10 % v/v) et nutriments); le troisième d'un sol biostimulé (bran de scie (10 % v/v) et nutriments); le quatrième d'un sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriments; enfin, le cinquième était composé d'un sol n'ayant reçu aucun traitement. De plus, un témoin abiotique a été ajouté à cette série. Dans les quatre premiers traitements, le contenu en eau a été ajusté à 25 % à l'aide d'une solution nutritive et dans le cinquième traitement le contenu en eau a été maintenu à sa valeur initiale (21 %). Les traitements ont été réalisés dans des réacteurs à lit fixe de 20 L, aérés à un taux de 0,1 m<sup>3</sup> d'air/m<sup>3</sup> de



sol/heure. Le suivi biologique a été réalisé à l'aide de quatre essais, soit : l'essai de mortalité du ver *Eisenia foetida*, l'essai de germination et de croissance du cresson *Lepidium sativum*, ainsi que l'essai Microtox® en phase solide. Le suivi chimique a été réalisé par la quantification massique des 16 HAP prioritaires et des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>. De plus, des essais de minéralisation du <sup>14</sup>C-phénanthrène ont été effectués avec des échantillons provenant de chaque traitement. Toutes les analyses ont été effectuées à quatre reprises, soit : aux temps 0, 5, 14 et 20 semaines.

Le suivi biologique a permis de constater que *P. chrysosporium*, par sa seule présence, n'a pas induit une hausse de la toxicité et que son action sur les HAP présents n'a pas conduit à une augmentation de la toxicité globale du sol au cours de son traitement. En effet, les résultats des différents essais ont montré un même niveau de toxicité dans tous les sols traités après 20 semaines de traitement. Des différents amendements étudiés (champignon, bran de scie et nutriments), il est apparu que l'ajout de nutriment avait la plus grande influence sur la détoxification puisque la toxicité était réduite dans les traitements avec nutriments par rapport au sol sans traitement.

Il apparaît que l'évaluation écotoxicologique est un outil fiable permettant d'évaluer l'efficacité de détoxification en s'appuyant sur une batterie d'essais de toxicité. De plus, les essais de toxicité utilisés corroborent les résultats obtenus du suivi chimique des contaminants.

La détoxification du sol et la biodégradation des HAP ont été très faibles sur les 20 semaines de traitement. Ce résultat a été principalement relié au type de contamination retrouvé dans le sol utilisé. En effet, le sol contenait des HAP et des hydrocarbures pétroliers présents depuis plusieurs années. Cette contamination météorisée a pu causer certaines limites d'ordre physico-chimique. Ainsi, il apparaît que les 20 semaines de traitement ont été insuffisantes pour détoxifier et décontaminer le sol à l'étude. L'utilisation d'un sol contaminé par des résidus âgés avait été préférée à celle d'un sol

reconstitué auquel auraient été ajoutés des composés chimiques purs; il représente mieux la réalité. Les résultats de la présente étude sont donc une évaluation représentative du suivi biologique et chimique lors du biotraitement d'un sol réel.

## ABSTRACT

The influence of bioaugmentation by *P. chrysosporium* and of biostimulation on the detoxification of a PAH-contaminated soil has been evaluated by a biological study as well as by a chemical one. This research's hypothesis was based on the fact that the degradation of high-molar weight PAH by microorganisms led to the production of metabolites more toxic than the "parent" compounds. Bioassays used during treatment would prove to be useful implements for the evaluation of the soil's detoxification.

The first step of the experiment was to find a methodology for the preparation of the inoculant. The selected methodology was grounded on three principal aspects : the choice of inoculation method onto the soil, the selection of the solid base used as a support for the growth of *P. chrysosporium* and the option of the optimum nutritious solution. Following the growth of the white-rot fungus on agar, it was transferred onto the solid base by the means of a known concentration of spore solution (spectrophotometry). The sawdust was selected as the growth support because it is easy to use, available and inexpensive. A compared study was completed to select the optimum nutritious solution. Therefore, solutions of glucose (10,08 g/L), starch (10,08 g/L), nitrogen (1,58 g/L), phosphate (4,53 g/L) and of a nutritious medium encouraging *P. chrysosporium*'s growth (C/N/P : 10,08/1,58/0,2 g/L) were compared. The result showed that the white-rot fungus contained by the presence of nitrogen added to a nutritious medium permitted a suitable inoculant production on sawdust.

To evaluate the influence of the bioaugmentation of the prepared inoculant, two studies were conducted. The first one used mineralization experiments to evaluate the complete contaminant's degradation (production of CO<sub>2</sub>). In the second study, chemical analysis was used to determine the residual concentration of the contaminant in the soil. To do so, a soil was artificially contaminated with phenanthrene so as to obtain a concentration of

100 mg/kg. One portion of the soil was bioaugmented with the inoculant in its nutrient-sawdust mixture while another portion was biostimulated by the addition of nutrients and/or sawdust. After 50 days of incubation, phenanthrene had mineralized up to 55 % in all the studied treatments. On the other hand, the chemical analysis showed the disappearance of almost 100 % of the phenanthrene in the same amount of time. Hence, the phenanthrene had not been completely mineralized. The presence of *P. chrysosporium* brought a negative transitory influence to the mineralization and to the disappearance of phenanthrene. As a matter of fact, the latent period was of 10 days for the treatment without *P. chrysosporium* compared to 13 days in the bioaugmented soil. After 14 days, the residual concentration of phenanthrene was of 70 mg/kg in the *P. chrysosporium* composed treatment against 35 mg/kg in the other treatment. Thus, the bioaugmentation did not increase the mineralization nor the biodegradation of phenanthrene in the artificially contaminated soil if compared to the results obtained by indigenous microorganisms alone.

The detoxification of a weathered PAH-contaminated soil was evaluated by a bioaugmentation and a biostimulation treatment. In order to do so, five different treatments were conducted so as to determinate the influence of the principal components. The first treatment consisted of a bioaugmented soil (*P. chrysosporium* on a nutrient-sawdust mixture and nutrients); the second one of a sterilized-bioaugmented soil (*P. chrysosporium* on a nutrient-sawdust mixture and nutrients); the third treatment was on a biostimulated soil (sawdust and nutrients); the fourth on a solely nutrient biostimulated soil, and finally on a soil which had received no treatment. An abiotic control was added in the series of treatments. In the first four treatments, the level of soil moisture was adjusted to 25 % with the use of a nutritious solution (MSM) while it was maintained to its original value in the fifth treatment (21 %). All five treatments have been conducted in 20 L reactors, aired to a rate of 0,1 m<sup>3</sup> air/m<sup>3</sup> soil/hour. The biological study have been completed by doing four bioassays : earthworm's mortality (*Eisenia foetida*), the germination and the growth of watercress (*Lepidium sativum*), and

Microtox® solid-phase test. The chemical analysis was realized on the basis of a quantification of the 16 USEPA priority PAH and of C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>. Moreover, mineralization experiments of <sup>14</sup>C-phenanthrene were completed on samples provided by each treatment. The analysis were done at four different times : at point 0, 5, 14 and 20 weeks.

The biological analysis showed that, by its mere presence, *P. chrysosporium*, did not increase the soil toxicity nor did its action on the PAH transformation lead to the global soil toxicity during the treatment. In fact, the results obtained by the different bioassays demonstrated a similar rate of toxicity in the treated soils after a period of 20 weeks. Of the different amendments studied (*P. chrysosporium*, sawdust and nutrients), it appeared that the nutrients' addition had the greatest influence on the detoxification since the toxicity level was lowered by the use of nutrients in treatments in comparison with the soil which received no treatment.

Therefore, the ecotoxicological evaluation is a usefull implement to determine the detoxification efficiency using a battery of bioassays. Moreover, the results obtained by the chemical analysis of the contaminants are validated by the bioassays.

The soil's detoxification and the PAH's biodegradation were very slight during the 20 weeks of treatment. This result is mainly related to the type of contamination found in the used soil. The PAH and the petroleum hydrocarbons contained in the soil had been there for many years. Therefore, this weathered PAH-contamination might have caused certain limits of a physico-chemical order. It is possible to conclude that 20 weeks of treatment are insufficient to detoxicate and decontaminate the soil that was being studied. The use of a weathered contaminated-soil was prefer to a reconstituted soil artificially contaminated. The motivation of this choice is the will to demonstrate the realistic reactions. The results obtained by the experiments thus demonstrate an evaluation of biological and chemical studies during the biotreatment of real soil.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>DÉDICACE .....</b>	<b>iv</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>v</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>xviii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>xxii</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>xxiii</b>
 <b>CHAPITRE I : INTRODUCTION .....</b>	 <b>1</b>
1.1 Problématique .....	1
1.2 Objectifs de recherche .....	3
 <b>CHAPITRE II : REVUE DE LA LITTÉRATURE .....</b>	 <b>5</b>
2.1 Problématique des sites contaminés par des composés xénobiotiques .....	5
2.2 Contexte réglementaire de la réhabilitation des sites .....	6
2.3 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) .....	10
2.3.1 Propriétés physico-chimiques et toxicité .....	10
2.3.2 Source des HAP .....	13
2.3.3 Voies métaboliques (biodégradation des HAP) .....	15
2.4 Traitement biologique des sols contaminés aux HAP .....	19
2.4.1 Traitement en biopile .....	21
2.4.1.1 Traitement par biostimulation .....	22
2.4.1.2 Traitement par bioaugmentation .....	23
2.5 Champignons de type carie blanche ( <i>white rot fungi</i> ) .....	24

2.5.1 Dégradation de la lignine par les champignons de type carie blanche.....	24
2.5.2 Mécanismes de dégradation utilisés par les champignons de type carie blanche .....	26
2.5.3 Avantages et limite à l'utilisation des champignons de type carie blanche .....	28
2.6 Évaluation de l'efficacité du traitement des sols contaminés .....	30
2.6.1 Suivi chimique .....	30
2.6.2 Suivi biologique .....	31

### **CHAPITRE III : PLAN EXPÉRIMENTAL .....**

3.1 Validation d'une méthodologie pour la préparation d'un inoculum de .....	
<i>P. chrysosporium</i> .....	35
3.1.1 Sélection et mise en place d'une méthodologie pour la préparation d'un inoculum de <i>P. chrysosporium</i> .....	35
3.1.2 Étude de l'efficacité de l'inoculum de <i>P. chrysosporium</i> préparé par un essai de biodégradation.....	36
3.2 Évaluation écotoxicologique et chimique associée au traitement biologique des sols contaminés .....	37
3.2.1 Sélection des traitements étudiés .....	38
3.2.2 Analyses effectuées pour évaluer l'efficacité des traitements.....	39
3.2.3 Fréquence des prélèvements .....	40

### **CHAPITRE IV : MISE EN PLACE D'UNE MÉTHODOLOGIE POUR LA PRÉPARATION D'UN INOCULUM DE *P. chrysosporium* .....**

4.1 Matériel et méthodes.....	43
4.1.1 Mode de préparation d'un inoculum de <i>P. chrysosporium</i> .....	43
4.1.1.1 Sélection du milieu de culture.....	43
4.1.1.2 Choix de la méthode d'inoculation du sol .....	44
4.1.1.3 Choix de la base solide .....	46
4.1.1.4 Choix des éléments nutritifs à ajouter à la base solide .....	46

4.1.2	Activité de biodégradation de <i>P. chrysosporium</i> sur un sol contaminé.....	48
4.1.2.1	Préparation de l'inoculum.....	48
4.1.2.2	Enrichissement artificiel d'un sol par du phénanthrène.....	49
4.1.2.3	Analyse chimique du phénanthrène dans le sol artificiellement contaminé ...	50
4.1.2.4	Biodégradation du phénanthrène en présence de <i>P. chrysosporium</i> .....	51
4.2	Résultats et discussion .....	56
4.2.1	Sélection du milieu de culture.....	56
4.2.2	Choix des éléments nutritifs à ajouter à la base solide .....	56
4.2.3	Homogénéité du sol de départ.....	58
4.2.4	Minéralisation du phénanthrène.....	59
4.2.5	Suivi de la concentration du phénanthrène .....	61
4.3	Conclusions.....	62

<b>CHAPITRE V : EFFET DE LA BIOAUGMENTATION ET DE LA</b>		
<b>BIOSTIMULATION SUR LA DÉTOXICATION D'UN SOL</b>		
<b>CONTAMINÉ AUX HAP .....</b>		
		<b>63</b>
5.1	Matériel et méthodes.....	64
5.1.1	Sol contaminé à l'étude.....	64
5.1.2	Traitements étudiés .....	66
5.1.2.1	Réacteur à lit fixe .....	67
5.1.2.2	Préparation des traitements et paramètres opératoires .....	70
5.1.2.3	Inoculum de <i>P. chrysosporium</i> utilisé.....	71
5.1.2.4	Échantillonnage des réacteurs à lit fixe et conservation des échantillons.....	71
5.1.3	Essais de toxicité.....	73
5.1.3.1	Essai de mortalité sur le ver <i>Eisenia foetida</i> .....	73
5.1.3.2	Essai de germination et de croissance sur le cresson <i>Lepidium sativum</i> .....	74



5.1.3.3 Essai Microtox® en phase solide sur la bactérie luminescente <i>Vibrio fischeri</i> .....	75
5.1.4 Analyses chimiques.....	77
5.1.4.1 HAP.....	77
5.1.4.2 C <sub>10</sub> -C <sub>50</sub> .....	78
5.1.4.3 Échantillons fortifiés .....	78
5.1.5 Suivi de la minéralisation de phénanthrène radioactif du témoin abiotique .....	80
5.1.6 Comparaison temporelle de la minéralisation de phénanthrène des différents traitements .....	81
5.1.7 Étude de la décoloration du Poly R sur gélose.....	81
5.2 Résultats et discussion .....	82
5.2.1 Caractéristiques initiales du sol contaminé.....	82
5.2.1.1 Réponse toxique initiale.....	82
5.2.1.2 Présence de micro-organismes dégradant les HAP.....	84
5.2.1.3 Caractérisation chimique du sol de départ .....	86
5.2.2 Aération des réacteurs .....	87
5.2.3 Homogénéité du sol de départ.....	89
5.2.4 Évolution de la toxicité globale du sol contaminé à l'étude lors de son traitement.....	92
5.2.4.1 Essai de toxicité sur le ver <i>Eisenia foetida</i> .....	92
5.2.4.2 Essai de toxicité sur le cresson <i>Lepidium sativum</i> .....	95
5.2.4.3 Essai de toxicité Microtox® en phase solide sur la bactérie luminescente <i>Vibrio fischeri</i> .....	104
5.2.5 Évolution de la concentration des HAP et C <sub>10</sub> -C <sub>50</sub> dans le sol contaminé à l'étude lors de son traitement.....	107
5.2.5.1 Contrôle de la qualité des analyses du laboratoire externe .....	107
5.2.5.2 Concentration résiduelle des HAP totaux .....	109

5.2.5.3	Concentration résiduelle des HAP de 3 anneaux .....	112
5.2.5.4	Concentration résiduelle des HAP de 4 anneaux .....	114
5.2.5.5	Concentration résiduelle des HAP de 5-6 anneaux.....	117
5.2.5.6	Concentration résiduelle des C <sub>10</sub> -C <sub>50</sub> .....	118
5.2.5.7	Comparaison temporelle de la minéralisation du phénanthrène dans les différents traitements .....	120
5.2.6	Comparaison des résultats obtenus du suivi biologique et chimique .....	122
5.3	Conclusions.....	123
 <b>CHAPITRE VI : CONCLUSION GÉNÉRALE ET RECOMMANDATIONS.....</b>		<b>125</b>
 <b>RÉFÉRENCES.....</b>		<b>129</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Grille de gestion des sols contaminés excavés.....	8
Tableau 2.2 : Propriétés physico-chimiques de quelques HAP .....	12
Tableau 2.3 : Liste des 16 HAP prioritaires tel qu'établie par l'US-EPA .....	13
Tableau 2.4 : Répartition des rejets totaux de HAP par secteur sources au Canada en 1990 .....	14
Tableau 2.5 : Conditions environnementales affectant l'activité des micro-organismes et domaine d'application .....	20
Tableau 4.1 : Solutions nutritives utilisées pour l'inoculation du bran de scie servant de support pour la croissance de <i>P. chrysosporium</i> .....	47
Tableau 4.2 : Observation qualitative de la propagation du champignon sur le support solide (bran de scie) en présence de différentes solutions nutritives après 1 semaine d'incubation.....	57
Tableau 4.3 : Concentration de phénanthrène dans le sol artificiellement contaminé .....	58
Tableau 5.1 : Composition en HAP de la solution de fortification .....	80
Tableau 5.2 : Résultat de toxicité du sol contaminé avant son traitement .....	83
Tableau 5.3 : Caractérisation chimique du sol provenant de la sablière Thouin de .....	
l'Assomption .....	86
Tableau 5.4 : Écarts-type obtenus pour les HAP suivis suite à l'analyse en duplicat des 11 réacteurs (jour 0) .....	89

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Structure chimique de quelques HAP .....	11
Figure 2.2 : Étapes initiales du métabolisme des HAP par l'action des micro-organismes. ....	17
Figure 2.3 : Métabolisme des HAP .....	19
Figure 2.4 : Traitement des sols contaminés en biopile statique .....	22
Figure 2.5 : Structure chimique de la lignine .....	25
Figure 2.6 : Voie métabolique proposée par Haemmerli <i>et al.</i> (1986) pour la dégradation du benzo(a)pyrène par <i>P. chrysosporium</i> .....	27
Figure 2.7 : Voie métabolique proposée par McFarland (1992) pour la dégradation du benzo(a)pyrène par <i>P. chrysosporium</i> . ....	27
Figure 3.1 : Schématisation temporelle des analyses effectuées durant l'expérience aux temps 0, 5, 14 et 20 semaines .....	41
Figure 4.1 : Méthodes pouvant être utilisées pour la préparation d'un inoculum de <i>P. chrysosporium</i> .....	45
Figure 4.2 : Système d'aération des microcosmes pour l'essai de minéralisation. ....	53
Figure 4.3 : Description schématique du montage utilisé lors de l'essai de biodégradation en microcosmes de 2 L. ....	55
Figure 4.4 : Minéralisation du <sup>14</sup> C-phénanthrène dans un sol artificiellement contaminé. ....	59
Figure 4.5 : Biodégradation du phénanthrène dans un sol artificiellement contaminé. ....	61
Figure 5.1 : Emplacement de la sablière Thouin .....	65
Figure 5.2 : Réacteur utilisé en laboratoire pour effectuer les traitements biologiques contrôlés. ....	68
Figure 5.3 : Vue d'ensemble de tous les réacteurs dans l'enceinte fermée .....	69
Figure 5.4 : Emplacement des détecteurs utilisés pour l'essai de traceur. ....	70
Figure 5.5 : Stratégie systématique d'échantillonnage utilisée pour un prélèvement représentatif de l'ensemble du volume de sol. (65 sous-échantillons). ....	72

Figure 5.6 : Préparation d'un échantillon pour les essais de toxicité, les analyses chimiques et l'essai de minéralisation.....	73
Figure 5.7 : Dispositif de filtration du Microtox® en phase solide .....	77
Figure 5.8 : Minéralisation du $^{14}\text{C}$ -phénanthrène, du $^{14}\text{C}$ -n-thracène et du $^{14}\text{C}$ -pyrène dans le sol contaminé. ....	85
Figure 5.9 : Distribution de l'argon radioactif à la sortie des réacteurs. ....	88
Figure 5.10 : Récupération des standards ajoutés aux 22 échantillons composites par le laboratoire externe (MAXXAM) lors de l'analyse initiale des sols (D10-anthracène, D10-pyrène, D12-benzo(a)pyrène). ....	91
Figure 5.11 : Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de pourcentage de mortalité du ver <i>Eisenia foetida</i> après 14 jours d'incubation. ....	93
Figure 5.12 : Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de pourcentage de germination du cresson <i>Lepidium sativum</i> après 4 jours d'incubation. ....	96
Figure 5.13 : Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de pourcentage d'émergence du cresson <i>Lepidium sativum</i> après 16 jours d'incubation.....	99
Figure 5.14 : Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de biomasse totale du cresson <i>Lepidium sativum</i> après 16 jours d'incubation.....	101
Figure 5.15 : Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de biomasse individuelle du cresson <i>Lepidium sativum</i> après 16 jours d'incubation.....	103
Figure 5.16 : Inhibition d'émission de lumière, mesurée par le Microtox® en phase solide, dans les sols contaminés provenant du traitement 1 pendant le biotraitement .....	105

Figure 5.17 : Récupération du D10-anthracène, du D10-pyrène et du D12-benzo(a)pyrène suite à l'ajout dosé effectué par le laboratoire externe pour les analyses effectuées après 0, 5, 14 et 20 semaines de traitement.....	108
Figure 5.18 : Évolution de la concentration en HAP totaux durant le traitement.....	110
Figure 5.19 : Biodégradation de l'acénaphthylène dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements .....	113
Figure 5.20 : Biodégradation des HAP formés de 4 anneaux dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements .....	114
Figure 5.21 : Biodégradation du fluoranthène, du pyrène, du benzo(a)anthracène et du chrysène dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements.....	116
Figure 5.22 : Biodégradation du benzo(a)pyrène dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements .....	118
Figure 5.23 : Concentration résiduelle en C <sub>10</sub> -C <sub>50</sub> dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements .....	119
Figure 5.24 : Minéralisation du <sup>14</sup> C-phénanthrène dans le sol contaminé à l'étude au temps initial, à la 5e, 14e et 20e semaine de traitement.....	121

## LISTE DES ANNEXES

<b>ANNEXE A : DESCRIPTION DES PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX .....</b>	<b>135</b>
A.1 Contenu en eau.....	136
A.2 Capacité de rétention en eau .....	136
A.2 Mesure du pH d'un sol.....	137
<b>ANNEXE B : COMPOSITION DES MILIEUX MINÉRAUX ET DES</b>	
<b>MILIEUX DE CULTURE .....</b>	<b>138</b>
B.1 Composition du milieu minéral salin (MSM) .....	139
B.2 Composition du milieu favorisant la croissance de <i>P. chrysosporium</i> (MFC) ....	140
B.3 Composition des milieux de culture.....	141
<b>ANNEXE C : RÉSULTATS BRUTS .....</b>	<b>142</b>
C.1 Résultats bruts du chapitre 4 .....	143
C.2 Résultats ayant mené au choix de la station d'échantillonnage (section 5.1.1) ....	144
C.3 Résultats bruts du chapitre 5 .....	146

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

é.t. : écart-type

Ci : curie

Dpm : désintégration par minute

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

KGy : kilogray

KOH : hydroxyde de potassium

MEF : Ministère de l'environnement et de la faune du Québec

meV : milliélectron Volt

MFC : milieu favorisant la croissance de *P. chrysosporium*

MSM : milieu minéral salin

n : nombre de réplikat

NaN<sub>3</sub> : azoture de sodim

PCP : pentachlorophénol

% p/p : pourcentage massique

% v/v : pourcentage volumique

US-EPA : Agence de protection environnementale des États-Unis



# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

---

### 1.1 Problématique

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants organiques retrouvés en grande concentration dans l'environnement, principalement en raison des activités humaines. En effet, formés lors d'une combustion incomplète de la matière organique, on les retrouve sur plusieurs sites industriels dont ceux associés à l'utilisation ou à la production de produits pétroliers, de gaz et d'agents de préservation pour le bois. Cette présence sur les sites industriels soulève des inquiétudes étant donné la cancérogénécité et la mutagénécité associées à certains HAP.

La remise en état des sites contaminés par les HAP fait l'objet d'un intérêt croissant dû à la connaissance des effets néfastes de ces polluants sur la santé humaine et sur l'environnement. Leur élimination nécessite donc l'utilisation de technologies de restauration les plus efficaces possibles.

La biorestauration des sols excavés est une technologie qui utilise les micro-organismes pour dégrader les polluants toxiques en composés moins dommageables (Wilson *et al.*, 1993). Cette méthode de décontamination offre un coût compétitif par rapport aux technologies traditionnelles telles que l'incinération. Le traitement en biopile peut être réalisé à l'aide de la biostimulation des micro-organismes indigènes ou bien par la bioaugmentation de micro-organismes spécifiques. Toutefois, les HAP de masse molaire élevée étant reconnus comme des produits récalcitrants à la biodégradation, les micro-

organismes utilisés dans le biotraitement sélectionné doivent posséder le potentiel de dégradation de ces contaminants.

Au cours des dernières années, la possibilité de traiter les sols contaminés par l'ajout de champignons de type carie blanche (*white rot fungi*) s'est traduite par des efforts de recherche accrus (Haught *et al.*, 1995). Plusieurs études ont montré que ces champignons sont capables de dégrader une large gamme de composés xénobiotiques, dont les HAP (Bumpus, 1989). Le champignon le plus étudié de cette catégorie est *Phanerochaete chrysosporium*. La non-spécificité du système exo-enzymatique de dégradation de ce champignon laisse envisager une application étendue à de nombreuses situations de contamination des sols, et ce, même si le potentiel de dégradation varie selon la stabilité chimique des contaminants.

Cependant, la formation de produits intermédiaires qui accompagne les étapes de dégradation soulève une question quant à l'efficacité véritable d'une bioaugmentation par *Phanerochaete chrysosporium* sur le plan de la détoxification d'un sol excavé contaminé aux HAP. En effet, plusieurs produits intermédiaires peuvent être formés par l'action des champignons de type carie blanche sur les HAP (Haemmerli *et al.*, 1986). Certains des produits intermédiaires peuvent prendre la forme de quinones, produits potentiellement mutagènes (Hammel *et al.*, 1986). La transformation des HAP peut aussi résulter en la polymérisation d'une partie des contaminants (Qiu *et al.*, 1991) qui, moins disponibles, seraient alors incomplètement dégradés par les micro-organismes présents dans l'environnement. Les métabolites pourraient donc être plus toxiques et moins disponibles dans l'environnement que le contaminant de départ (Morgan *et al.* 1991). Ces problèmes potentiels doivent donc être considérés avant l'application des champignons de type carie blanche dans un traitement de sols contaminés.

Au-delà de la toxicité potentiellement induite par les champignons, le procédé de traitement des sols par biopiles peut lui aussi être source de toxicité. Il existe peu de

données publiées sur la toxicité résiduelle des sols et des eaux de lixiviation suite à un traitement biologique. En phase aqueuse, les hydrocarbures pétroliers sont toxiques vis à vis de nombreux organismes (Ma *et al.*, 1995). De plus, certains HAP sont reconnus pour leur haut potentiel carcinogène (Cookson, 1995). Des résultats préliminaires de caractérisation d'un sol contaminé avec 2000 mg/kg d'huiles et graisses minérales ont montré qu'il n'y avait pas de toxicité décelable dans la phase liquide issue d'un test de lixiviation [Microtox, SOS Chromotest ( $\pm$  S9) et Selenastrum] (Renoux *et al.*, 1995). Il est par contre reconnu que les hydrocarbures tendent à s'adsorber fortement dans les sols de par leur caractère hydrophobe. Ce phénomène peut expliquer le faible niveau de toxicité généralement observé dans les eaux de lixiviation. Cependant la toxicité, évaluée directement sur la matrice de sol, peut être mise en relation avec l'augmentation de la biodisponibilité ou la présence de substances pouvant interférer avec les essais de toxicité.

## 1.2 Objectifs de recherche

L'objectif du projet est de vérifier l'effet d'une bioaugmentation à l'aide de *P. chrysosporium* et d'une biostimulation sur la détoxification d'un sol contaminé aux HAP. L'hypothèse de recherche est basée sur le fait que l'action des micro-organismes (champignon et microflore indigène) sur les contaminants de masse molaire élevée conduirait à l'augmentation de la toxicité du sol par la production de métabolites plus toxiques que les contaminants initiaux. La simple présence de champignons pourrait également augmenter la toxicité du sol. En effet, certains champignons sont reconnus pour produire des toxines très puissantes (mycotoxines). Des essais de toxicité utilisés en cours de traitement s'avéreraient des outils pertinents pour l'évaluation de la détoxification du sol. Ce projet propose d'utiliser la nouvelle approche préconisée par le Ministère de l'environnement et de la faune du Québec, à savoir l'utilisation de essais de toxicité de façon à effectuer une évaluation écotoxicologique en parallèle à l'analyse chimique.

Le contenu général du mémoire est articulé selon le plan suivant :

- revue de la littérature;
- plan expérimental;
- mise en place d'une méthodologie pour la préparation d'un inoculum de *P. chrysosporium* viable servant à la bioaugmentation d'un sol contaminé en vue de son traitement;
- effet de la bioaugmentation et de la biostimulation d'un sol contaminé aux HAP sur l'évolution de la toxicité et la concentration en HAP.

## CHAPITRE II

### REVUE DE LA LITTÉRATURE

---

La revue de littérature, présentée dans ce chapitre, ne se veut pas exhaustive. Elle a pour objectif principal de souligner les éléments clefs qui permettent la compréhension de l'évaluation du risque écotoxicologique associé à l'utilisation du champignon *P. chrysosporium* pour la biorestauration des sols contaminés aux hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Elle explore donc en premier lieu la problématique des sites contaminés aux composés xénobiotiques organiques afin de mieux intégrer le concept de leur biotraitement dans le contexte réglementaire québécois dans lequel s'inscrit la restauration des sols. Les propriétés des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), leur source et les voies métaboliques pouvant mener à leur dégradation sont ensuite présentées. Puis, la biorestauration des sols contaminés aux HAP est abordée, plus particulièrement dans la perspective du traitement en biopiles. Ensuite, la restauration biologique utilisant les champignons de type carie blanche est présentée. Le dernier volet concerne les techniques d'évaluation de l'efficacité de traitement, soit le suivi chimique par bilan massique des contaminants et le suivi biologique par l'utilisation des essais de toxicité.

#### **2.1 Problématique des sites contaminés par des composés xénobiotiques**

La remise en état des sites contaminés par les composés xénobiotiques fait l'objet d'un intérêt croissant dû à la connaissance des effets néfastes de ces polluants sur la santé humaine et sur l'environnement (Singleton, 1994; Wilson et Jones, 1993). Plusieurs de

ces composés xénobiotiques persistent dans l'environnement, et certains tendent à s'accumuler dans la graisse des animaux des niveaux trophiques supérieurs. Cette bioaccumulation peut être causée par l'incapacité des micro-organismes à dégrader ces polluants ou par la lenteur de leur métabolisme (Bumpus *et al.*, 1985). Elle peut aussi résulter de conditions environnementales défavorables à la biodégradation qui ne soutiennent pas la croissance microbienne ou qui réduisent la disponibilité des composés xénobiotiques (Singleton, 1994).

La contamination d'un site peut survenir par le rejet d'effluent industriels contaminés dans les eaux. Elle peut aussi découler du contact du site avec des dérivés du charbon et du pétrole, avec des préservatifs issus du traitement du bois ou avec des lixiviats d'un site d'enfouissement. Ces différents scénarios ont un point commun : la complexité de la contamination. En effet, un site est rarement contaminé par un contaminant unique. Chaque contaminant impliqué possède ses propres propriétés physico-chimiques (solubilité, volatilité,...) et interagit différemment selon la nature de l'écosystème touché. Par conséquent, il est essentiel d'établir les caractéristiques propres à chaque site contaminé de façon à maximiser leur traitement (Singleton, 1994). La particularité de chaque site et de sa contamination propre fait en sorte qu'il est primordial de procéder au cas par cas et, de ce fait, d'utiliser les techniques qui offriront le meilleur potentiel du point de vue de la décontamination.

## **2.2 Contexte réglementaire de la réhabilitation des sites**

Les interventions dans le domaine des sols contaminés sont encadrés par la *Politique de protection et de réhabilitation des terrains contaminés* (MEF, 1998) et par plusieurs articles de la *Loi sur la qualité de l'environnement* (LQE) (L.R.Q., ch. Q-2, articles 20, 22, 25, 31.42 à 31.45, 114.1, 115.1, etc.). Plus spécifiquement, les articles 25 et 26, 114.1, 31.42 et 31.43 de la LQE permettent au Ministre d'ordonner aux responsables ou

aux propriétaires des interventions dans le domaine des sols contaminés (études de caractérisation, mesures de restauration, etc.). Dans certains cas, un certificat d'autorisation (article 22 de la LQE) peut même être exigé. Plusieurs autres lois et règlements s'appliquent dans le domaine de la protection des sols et de la réhabilitation des lieux contaminés. Notamment le *Règlement sur les déchets dangereux*, le *Règlement sur les déchets solides*, le *Règlement sur les produits pétroliers*, et le *Règlement sur les substances minérales autres que le pétrole, le gaz naturel et la saumure*.

La *Politique de protection et de réhabilitation des terrains contaminés* (MEF, 1998) a pour objectifs d'éviter que la santé humaine ne soit mise en cause lors de la réutilisation de terrains contaminés et de fournir les outils nécessaires pour l'évaluation du niveau de contamination des sols. Cette politique poursuit le travail amorcé par la politique de 1988 tout en répondant mieux aux problématiques et préoccupations actuelles. Elle favorise la réutilisation des zones contaminées tout en protégeant les futurs usagers.

Étant donné les différents éléments servant à établir le risque (sensibilité du milieu, la nature et l'ampleur de la contamination et les usages actuel et futur du terrain), la sélection de l'activité de restauration à effectuer permet maintenant une certaine souplesse afin que les solutions retenues soient proportionnelles aux problèmes vécus ou appréhendés. Le processus élaboré par le MEF offre donc diverses options pour sélectionner l'intervention à effectuer sur un terrain contaminé (MEF, 1998):

- la décontamination aux critères génériques d'usage;
- la décontamination aux critères spécifiques déterminés à l'aide de la procédure d'évaluation des risques;
- la mise en place de mesures de confinement, contrôle et suivi passives ou actives;
- la mise en place de mesures restrictives.

Le tableau 2.1 présente les options possibles de gestion reliées à l'utilisation de critères génériques d'usage qui ne tiennent compte que de la concentration du contaminant dans le milieu. Ces critères sont utilisés pour évaluer les impacts ou le risque que constitue un terrain et pour établir les objectifs de décontamination à atteindre pour un usage donné. Ces critères génériques sont classés, pour chacun des contaminants, en trois valeurs-seuils qui délimitent trois plage d'intervention (A, B, C).

**Tableau 2.1: Grille de gestion des sols contaminés excavés (MEF, 1998)**

Niveau de contamination	Option possibles de gestion
< A	Bruit de fond en ce qui concerne les contaminants se retrouvant de façon naturelle dans le milieu et limite de détection pour les produits chimiques organiques. → Utilisation sans restriction.
Plage A - B	Sol ou eau souterraine faiblement contaminés. Interrogation sur les sources possibles de contamination et vérification si l'apport en nouveaux contaminants est toujours présent. → Utilisation comme matériaux de remblayage (si la contamination du milieu récepteur n'en est pas augmentée et si les sols n'émettent pas d'odeurs d'hydrocarbures perceptibles); → Utilisation comme matériaux de recouvrement journalier dans un lieu d'enfouissement sanitaire (LES).
valeur B	Seuil à partir duquel des analyses approfondies sont nécessaires. → Utilisation restreinte.
plage B - C	Sol ou eau souterraine contaminés. → Décontamination dans un lieu de traitement autorisé; → Utilisation comme matériaux de remblayage sur le terrain d'origine (si les sols ont fait l'objet d'un traitement optimal et si l'usage de ce terrain soit à vocation industrielle ou commerciale); → Dépôt dans un LES comme matériaux acceptables.
valeur C	Seuil à partir duquel il peut y avoir nécessité d'une action correctrice dans un bref délai. → Tous les usages y sont restreints
> C	Sol ou eau souterraine contaminés. Étude approfondie nécessaire et selon toute probabilité des travaux de décontamination à effectuer avant la réhabilitation. → Décontamination dans un lieu de traitement autorisé; → Dépôt définitif dans un lieu d'enfouissement sécuritaire autorisé.

Dans la nouvelle politique le mode de sélection de l'intervention ne repose plus entièrement sur les critères génériques (concentration des contaminants) comme c'était le cas dans l'ancienne politique. En effet, la notion d'évaluation de risque y est ajoutée.



Cette nouvelle méthode permet d'évaluer le risque que constitue un terrain pour la santé humaine, la faune et la flore, d'établir des critères spécifiques de décontamination, de déterminer quels types de mesures correctrices sont nécessaires pour gérer le risque et enfin, d'évaluer le risque résiduel découlant de l'application des mesures (MEF, 1998). Lorsque l'évaluation des risques est sélectionnée, il est obligatoire de procéder à une évaluation de risques toxicologiques, du risque écotoxicologique et des impacts sur l'eau souterraine et l'eau de surface. Comme spécifié dans la nouvelle politique, l'analyse de risque toxicologique est " une démarche systématique et prospective qui vise à identifier et à quantifier les risques associés à l'exposition d'un individu ou d'une population cible à des contaminants présents dans différents milieux ". Cette démarche sera prochainement standardisée par le MEF (automne 1998). En ce qui a trait à l'évaluation du risque écotoxicologique, elle constitue " un processus rationnel d'identification, de comparaison et d'analyse de mesures descriptives visant à estimer les probabilités d'occurrence d'effets néfastes chez un récepteur écologique en fonction de son exposition à un ou plusieurs contaminants ". Les procédures standardisées se retrouvent dans le document du MEF sur la *Procédure d'évaluation du risque écotoxicologique* qui sera disponible dans sa version finale à l'automne 1998. Enfin, l'évaluation des impacts sur l'eau souterraine et l'eau de surface est réalisée à partir des critères d'usage associés à cette eau. Suite à l'analyse des risques, les mesures correctrices devront être sélectionnées de manière à rendre le risque associé au terrain non significatif.

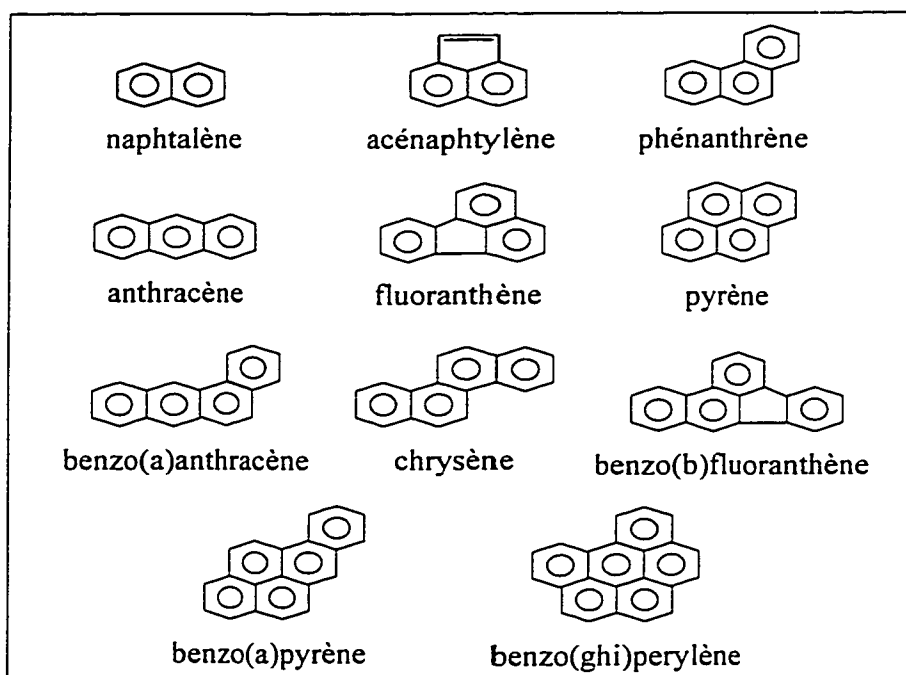
Les stratégies d'intervention présentées répondent au volet réhabilitation de la politique. Ainsi, ils permettent, à court terme de mettre fin aux impacts des terrains contaminés et, à long terme, de les réhabiliter de façon à leur permettre de réintégrer le cycle du développement durable.

## **2.3 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)**

La présence des HAP dans l'environnement, générés par les activités anthropogéniques, soulève des inquiétudes étant donné la nature cancérigène et mutagène associée à certains d'entre eux. Les HAP sont, de part leur nature, relativement stables et récalcitrants dans les sols et sont par conséquent moins biodégradables que d'autres composés organiques. Ainsi, les traitements conventionnels efficaces pour la dégradation de composés plus biodégradables ou plus solubles ne le sont pas nécessairement pour les HAP (Wilson et Jones, 1993).

### **2.3.1 Propriétés physico-chimiques et toxicité**

Les HAP sont des composés organiques neutres, non polaires, formés uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène. Leur structure moléculaire renferme deux ou plusieurs cycles benzéniques (ou anneaux). Il existe plus d'une centaine de substances qui composent la famille des HAP. La figure 2.1 présente la structure chimique de quelques uns des HAP formés de 2, 3, 4, 5 et 6 anneaux.



**Figure 2.1: Structure chimique de quelques HAP (Wilson et Jones, 1993).**

À l'état pur, les HAP se présentent habituellement sous la forme de solides cristallins plus ou moins colorés. Ils possèdent des points de fusion et d'ébullition élevés, une faible tension de vapeur, une faible solubilité dans l'eau et une grande capacité d'adsorption à la surface des particules (Saucier, 1988). Le tableau 2.2 présente les propriétés physiques de quelques HAP. Ces propriétés varient selon le nombre d'anneaux qui les constituent. Ainsi, plus le nombre d'anneaux est élevé plus le composé possède une masse molaire élevée, cette dernière passe de 128,16 pour le naphthalène (2 anneaux) à 276 pour l'indéno[1,2,3-cd]pyrène (6 anneaux). La solubilité et la volatilité diminuent avec l'augmentation du nombre d'anneaux. La solubilité varie beaucoup (31,7 à 0,00053 mg/L) entre le naphthalène et l'indéno[1,2,3-cd]pyrène de même que la volatilité ( $11\,960$  à  $1,3 \cdot 10^{-5}$ ). Les HAP sont en général des composés chimiques très hydrophobes. Par conséquent, suite à la contamination d'un site, une très grande fraction des HAP se retrouve adsorbée sur les particules de sol (Cookson, 1995).

**Tableau 2.2 : Propriétés physico-chimiques de quelques HAP (Environnement Canada, 1993c)**

HAP	Masse molaire (g)	Solubilité dans l'eau <sup>(1)</sup> (mg/L)	Tension de vapeur <sup>(1)</sup> (mPa)	Log K <sub>ow</sub>
naphtalène	128,16	31,7	11 960	3,5
acénaphène	154,21	3,42	594	4,33
phénanthrène	178,24	1,29	90,7	4,5
anthracène	178,24	0,045	25	4,5
fluoranthène	202,26	0,26	1 328	5,1
pyrène	202,26	0,135	$91,3 \cdot 10^{-6}$	4,9
benzo[a]anthracène	228	0,0057	$14,7 \cdot 10^{-3}$	5,6
benzo[b]fluoranthène	252,32	0,014	de $0,13 \cdot 10^{-5}$ à $0,133$ à 20° C	6,06
benzo[a]pyrène	252,32	0,0038	$0,37 \cdot 10^{-6}$	6,0
indéno[1,2,3-cd]pyrène	276	0,00053	$1,3 \cdot 10^{-5}$	6,4

(1) : à 25° C.

Plusieurs membres de cette classe de composés sont considérés dangereux et toxiques (Environnement Canada, 1993a; Gerstl *et al.*, 1989). Leur potentiel de bioaccumulation est élevé, et plusieurs d'entre eux sont considérés cancérigènes (Cheremisinoff, 1995). De plus, plusieurs HAP, dont le benzo(a)pyrène, sont considérés nuisibles pour la santé humaine. En 1988, Saucier a fait remarquer que l'activité cancérigène était plus marquée pour les HAP contenant au moins 4 anneaux aromatiques. Seize HAP ont été inclus dans la liste internationalement connue de l'US-EPA (*United States - Environmental Protection Agency*) sur les polluants prioritaires devant faire l'objet d'un suivi dans les effluents industriels. Le tableau suivant présente ces 16 HAP.

**Tableau 2.3 : Liste des 16 HAP prioritaires tel qu'établie par l'US-EPA**

<b>2 anneaux</b> Naphthalène		<b>5 anneaux</b> Benzo[b]fluoranthène Benzo[k]fluoranthène Benzo[a]pyrène Dibenzo[ah]anthracène
<b>3 anneaux</b> Acénaphthylène Acénaphtène Fluorène Phénanthrène Anthracène	<b>4 anneaux</b> Fluoranthène Pyrène Benzo[a]anthracène Chrysène	<b>6 anneaux</b> Indeno[1,2,3-cd]pyrène benzo[ghi]pérylène

### 2.3.2 Source des HAP

Les HAP sont omniprésents dans l'environnement et sont retrouvés en grande concentration sur plusieurs sites industriels dont ceux associés à la production du pétrole et du gaz, et à la préservation du bois (Wilson et Jones, 1993).

Les HAP sont produits lors de la combustion de matière organique. La température de combustion influence la composition du mélange de HAP ainsi formé (Wilson et Jones, 1993). La source des HAP peut être naturelle; par exemple lors de phénomènes géologiques (volcans, production d'énergie fossile, ...) et des feux de forêt (Wilson et Jones, 1993). La dispersion des HAP dans l'environnement peut aussi être causée par des activités anthropogéniques. Le tableau 2.4 présente les principales sources de rejet des HAP dans l'ensemble du Canada.

**Tableau 2.4 : Répartition des rejets totaux de HAP par secteur sources au Canada en 1990 (Environnement Canada, 1993a et 1993b)**

Secteur	rejet de HAP (kg/an)
<b>Diffus</b>	2 441 227
feux de forêts (82,23 %)	
brûlage abattis (14,64 %)	
déversements (3,13 %)	
autres (< 0,01 %)	
<b>Industriel</b>	960 231
aluminerie (96,35 %)	
sidérurgie (2,03 %)	
coke métallurgique (1,34 %)	
autres (0,29 %)	
<b>Combustion</b>	533 020
bois résidentiel (88,91 %)	
combustion industrielle (2,99 %)	
centrales thermiques (2,12 %)	
autres (5,98 %)	
<b>Incinération</b>	251 274
brûleurs conique (99,06 %)	
autres (0,94 %)	
<b>Transport</b>	200 391
routier - diesel (77,18 %)	
routier - essence (22,22 %)	
autres (0,60 %)	

Les feux de forêt sont la principale source de rejet de HAP au Canada. Bien qu'ils peuvent affecter de façon intense la qualité de l'atmosphère, ils sont une source saisonnière et ponctuelle contrairement aux sources fixes (industries, incinération, ...) et à certaines sources diffuses comme le transport (Environnement Canada, 1993a). Les autres principales sources de rejet des HAP dans l'atmosphère sont les alumineries, le chauffage résidentiel au bois, les feux à ciel ouvert, l'incinération des résidus de bois - brûleurs coniques et le transport routier au diesel et à l'essence. Les principales sources de contamination par des rejets liquides sont l'utilisation de bois traité à la créosote et le déversement de produits pétroliers (Environnement Canada, 1993a). La créosote contient environ 85 % de HAP (Wilson et Jones, 1993). L'infiltration de la créosote au cours des

opérations de traitement et les lixiviats provenant de l'entreposage du bois traité représentent donc des sources potentielles de contamination par les HAP. La contamination des sols par les HAP résulte également de l'exploration, de la production, du transport (pipeline, route, chemins de fer), du raffinage, de l'entreposage et de la commercialisation du pétrole (Environnement Canada, 1993a).

### **2.3.3 Voies métaboliques (biodégradation des HAP)**

En général, les HAP constitués de 2 ou 3 anneaux sont rapidement biodégradés alors que ceux possédant 4 anneaux ou plus sont généralement plus récalcitrants (Cerniglia, 1993; Cheremissinoff, 1995). Ainsi, la biodégradation des HAP dépend de la complexité de leur structure chimique (Cookson, 1995). En effet, le contaminant qui induit par sa biodégradation le plus gros taux de croissance microbienne sera dégradé en premier. De plus, l'adsorption des HAP, causée par leur faible solubilité, limite leur biodégradation en diminuant leur biodisponibilité.

En plus de la complexité de la structure chimique, les propriétés physico-chimiques associées à la matrice de sol peuvent limiter la biodégradation des HAP (Seech *et al.*, 1992). En effet, le sol constitue une matrice hétérogène où la présence et l'activité des micro-organismes ne sont pas uniformément réparties. L'hétérogénéité du transfert d'oxygène, de la quantité d'eau biologiquement disponible, de la disponibilité en carbone et nutriments et de la répartition des contaminants peut donc limiter la biodégradation. De plus, la présence de matière organique augmente le pouvoir adsorbant du milieu et diminue ainsi la biodégradation des HAP.

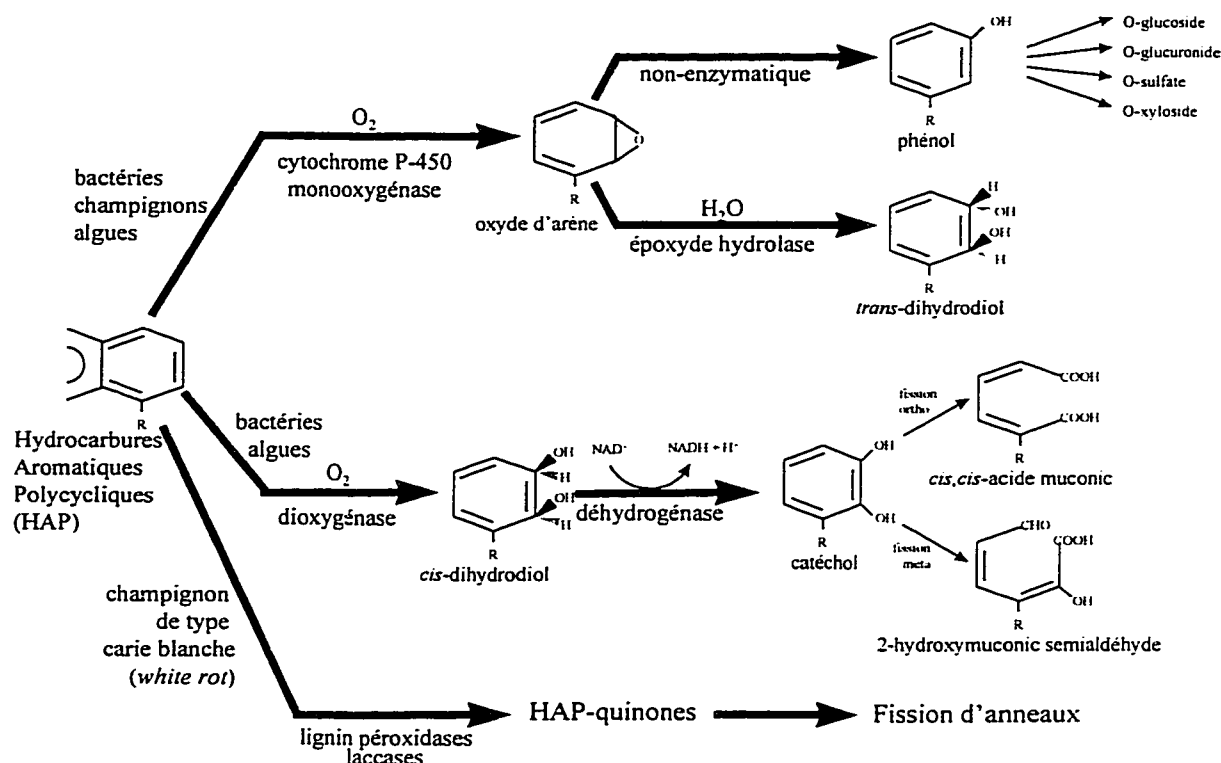
La biodégradation des HAP présents dans un sol contaminé est un phénomène complexe dans lequel est impliqué un consortium de micro-organismes utilisant différentes voies métaboliques. La complexité du processus de biodégradation est reliée à plusieurs

facteurs. Tout d'abord, il faut tenir compte du fait qu'une condition environnementale donnée favorise la présence d'une population microbienne plutôt qu'une autre, et pas nécessairement celle que l'on souhaite (Samson, 1996). De plus d'autres facteurs tels le manque de source de carbone et d'énergie permettant la croissance des micro-organismes, le manque de nutriments essentiels (azote, phosphore), la toxicité des polluants ou des métabolites secondaires, l'inaccessibilité des polluants, la liaison du polluant avec des composés organiques résistant à la biodégradation, l'empêchement des molécules à pénétrer dans les micro-organismes, la nécessité d'une flore hétérogène, la prédation des bactéries par des organismes supérieurs sont autant de raisons pour lesquelles les micro-organismes ont de la difficulté à dégrader les polluants les plus récalcitrants.

Bien que le mécanisme utilisé pour la biodégradation aérobie des HAP varie d'un composé à l'autre, tous les mécanismes impliquent l'incorporation d'un oxygène dans le cycle, le bris d'anneaux et la production d'intermédiaires (Cookson, 1995).

Plusieurs classes de micro-organismes possèdent la capacité de dégrader les HAP (Cerniglia, 1993). La figure 2.2 présente les étapes initiales qui conduisent à l'oxydation des HAP par l'action de trois classes de micro-organismes, soit les bactéries, les champignons et les algues.





**Figure 2.2 : Étapes initiales du métabolisme des HAP par l'action des micro-organismes (Cerniglia, 1993; Atlas et Cerniglia, 1995).**

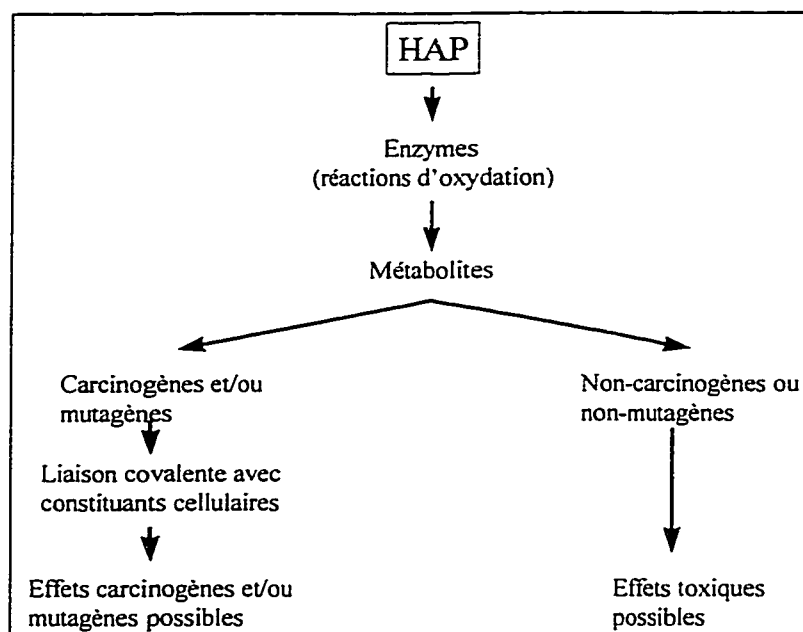
Deux enzymes peuvent être utilisées par les bactéries pour effectuer la dégradation des HAP. L'attaque enzymatique de la dioxygénase sur un anneau aromatique conduit à la formation d'un *cis*-dihydrodiol alors que l'oxydation effectuée par la monooxygénase forme un *trans*-dihydrodiol. Ces enzymes sont sécrétés de façon intracellulaire. Les bactéries utilisant ces enzymes doivent donc incorporer les HAP dans leur cellule avant de procéder à leur dégradation. La formation de *cis*-dihydrodiol suggère que les algues procèdent à la dégradation des HAP à l'aide d'une réaction catalysée par la dioxygénase, similaire à celle effectuée par les bactéries (Cerniglia, 1993).

La comparaison spécifique de la voie métabolique utilisée par les bactéries et les champignons montre que ces derniers, contrairement aux bactéries, n'utilisent pas les HAP comme seule source de carbone et d'énergie mais transforme les HAP par co-

métabolisme. Plusieurs enzymes peuvent être utilisées : cytochrome P-450, monooxygénases et les lignines peroxydases. Le cytochrome P-450 incorpore un atome d'oxygène dans la molécule de HAP pour former un oxyde d'arène, lequel se transforme spontanément en phénol qui pourra se conjuguer par exemple avec le sulfate, le glucose ou le xylose. Les enzymes extracellulaires, les lignines peroxydases, initient l'attaque des radicaux libre par un simple transfert d'électron pour former des quinones. La voie métabolique utilisée par les champignons de type carie blanche possède l'avantage d'être extracellulaire. Il n'est donc pas nécessaire pour ces champignons d'incorporer le polluant avant de procéder à leur dégradation.

Lors de la dégradation des HAP, par les champignons, plusieurs métabolites sont formés, incluant les *trans*-dihydrol, les phénols et les quinones. Ces métabolites peuvent être incorporés à la matière organique (humification) ou être polymérisés. Cependant, étant donné la possibilité que les métabolites formés soient plus toxiques que les HAP initialement présents il est essentiel de déterminer le potentiel toxique de ces métabolites (Singleton, 1994).

La figure suivante schématise la voie métabolique possible des HAP dans l'organisme humain.



**Figure 2.3 : Métabolisme des HAP (Saucier, 1988).**

Certaines enzymes oxydases peuvent transformer les HAP en métabolites mutagènes et/ou cancérogènes (Cookson, 1995; Saucier, 1988). Cette théorie serait une explication plausible au fait qu'on retrouve rarement des HAP dans les tissus vivants mais qu'on y retrouve plutôt des sous-produits de dégradation (ou métabolites).

## **2.4 Traitement biologique des sols contaminés aux HAP**

L'étude du métabolisme microbien des composés xénobiotiques a amené l'émergence de l'utilisation des micro-organismes pour l'enlèvement des contaminants par la biodégradation. L'activité de ces micro-organismes indigènes dépend toutefois des conditions environnementales présentes dans le sol. Bien que les conditions environnementales puissent limiter le métabolisme microbien, il est possible de les ajuster et les contrôler de façon à promouvoir la biodégradation. L'objectif de la

biorémediation est donc d'optimiser ces facteurs, de telle sorte que la minéralisation devienne l'aboutissement du traitement. Le tableau suivant présente les conditions environnementales critiques.

**Tableau 2.5: Conditions environnementales affectant l'activité des micro-organismes et domaine d'application (Sims *et al.*, 1989)**

Conditions environnementales	Niveaux optimums
Contenu en eau	25 - 85 % de la capacité de rétention en eau (-0,01 MPa)
Oxygène	porosité > 10 %
pH	5,5 - 8,5
Nutriments	azote, phosphore et autres nutriments afin de ne pas limiter la croissance microbienne (C/N/P suggéré = 120/10/1)
Température	15 - 45°C (mésophiles)

L'eau est essentielle pour la survie des micro-organismes. C'est à travers cette phase aqueuse que sont transportés plusieurs nutriments et composés organiques jusqu'à la cellule microbienne (Sims *et al.*, 1989). Le contenu en eau du sol affecte l'aération, la nature et la quantité de composés dissous, la pression osmotique et le pH du sol.

La présence d'oxygène est essentielle pour la biodégradation aérobie des composés organiques. L'aération du sol dépend du contenu en eau du sol. En effet, lorsque les pores du sol deviennent remplis d'eau la diffusion des gaz à travers le sol devient limitée. Ainsi, le taux de consommation d'oxygène pourrait être plus grand que celui de la diffusion du gaz. La granulométrie du sol influence aussi l'oxygénation. Un sol très argileux possède une capacité de rétention en eau élevée ce qui limite la diffusion de l'oxygène à travers le sol.

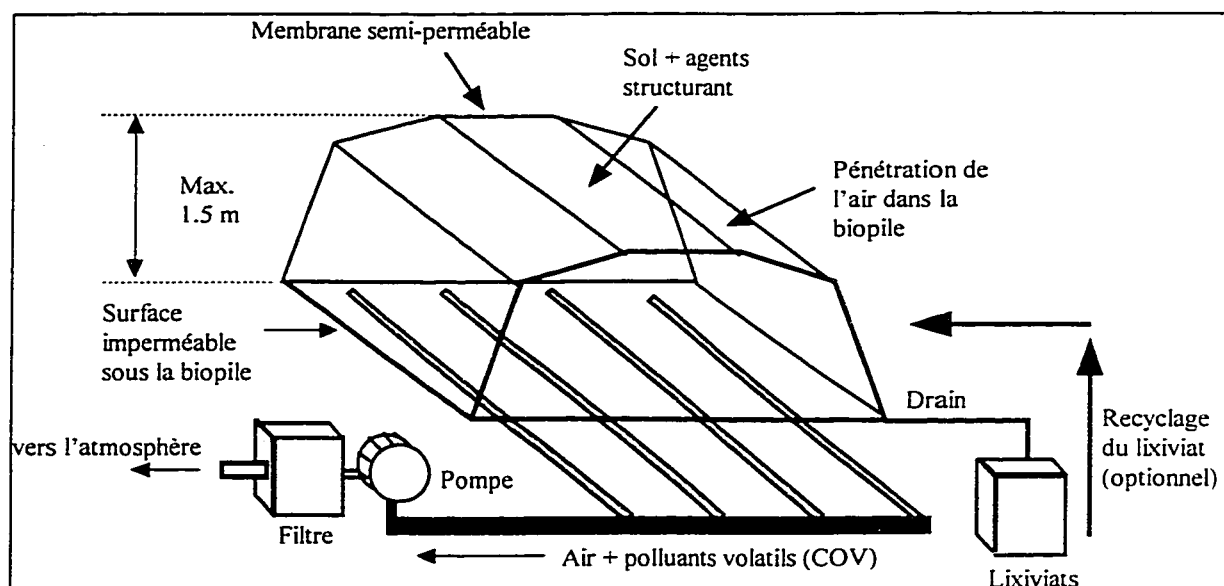
Le pH influence l'activité des micro-organismes (les champignons sont plus tolérant aux conditions acides (pH<5,5) que les bactéries) et la solubilité de certains nutriments. Lors

d'un traitement en biopile, la présence des nutriments peut être ajustée en fonction des quantités déjà présentes dans le sol contaminé. Enfin, la vitesse de biodégradation des composés organiques diminue avec la réduction de la température (Sims *et al.*, 1989). Tous ces facteurs environnementaux interagissent les uns avec les autres et peuvent affecter le traitement des composés organiques.

### 2.4.1 Traitements en biopile

Dans le cadre de la présente recherche, le traitement du sol de surface en biopile est étudié. Le traitement en biopile est une option non coûteuse qui a fait ses preuves pour les hydrocarbures pétroliers (Samson, 1996). Ce traitement peut être effectué par la stimulation de la microflore indigène (biostimulation), par l'ajout d'une microflore adaptée (bioaugmentation) ou par une combinaison des deux.

Le traitement des sols contaminés en biopile vise à favoriser, optimiser et contrôler le phénomène naturel de biodégradation des hydrocarbures dans les sols (Atlas, 1995). La figure 2.4 présente la configuration des biopiles. Suite à son excavation, le sol contaminé est acheminé sur une surface imperméable. Cette surface est conçue en cuvette de rétention et est munie d'un drain qui permet la récupération des contaminants lixiviables et leur recyclage dans la biopile (Samson, 1996). Afin de réduire la formation de lixiviat et d'assurer un meilleur contrôle des conditions environnementales, une membrane semi-imperméable recouvre la pile. La hauteur des piles ne dépasse pas 1,5 m et des agents structurants (copeaux de bois) peuvent être ajoutés au sol de manière à réduire sa compaction et favoriser la circulation de l'air. L'aération est réalisée par aspiration de l'air à travers la biopile (pression négative) et le taux d'aspiration se situe généralement entre 80 et 120 m<sup>3</sup> d'air/heure/1000 m<sup>3</sup> (tonne) de sol (Samson, 1996).



**Figure 2.4: Traitement des sols contaminés en biopile statique (Samson, 1996).**

### 2.4.1.1 Traitement par biostimulation

Le traitement en biopile des sols contaminés par biostimulation repose sur la création d'un environnement favorable à la croissance des micro-organismes indigènes du sol qui ont la capacité de dégrader les contaminants présents (Forsyth *et al.*, 1995). L'ajout de nutriments (azote, phosphore), d'agent structurant, l'ajustement du contenu en eau et l'aération sont autant de moyens servant à stimuler les micro-organismes.

La biorestauration de sols contaminés par biostimulation requiert la présence de certaines conditions environnementales initiales essentielles. Une étude réalisée par Forsyth *et al.* (1995) propose trois conditions sous lesquelles un traitement par biostimulation devrait être préféré à celui par bioaugmentation. Le sol doit contenir une quantité suffisante de micro-organismes aptes à dégrader le contaminant ciblé, soit une concentration initiale supérieure à  $10^5$ /g sol. Si le sol ne possède pas une concentration suffisante en micro-organisme, s'il est récemment contaminé ou si la présence de toxiques limite la capacité

de reproduction des micro-organismes indigènes, le traitement par biostimulation pourrait ne pas être efficace. La contamination du sol doit être telle qu'elle n'est ni toxique, ni inhibitrice pour les micro-organismes indigènes, que des métabolites toxiques ne sont pas accumulés dans le milieu et qu'elle ne nécessite pas un prétraitement physico-chimique qui enlèverait l'activité biologique du sol. Enfin, dans le cas où les micro-organismes sont en quantité suffisante et qu'ils possèdent le potentiel de biodégradation des contaminants présents, la durée et le coût associé à la décontamination ne doivent pas être des facteurs limitants.

#### **2.4.1.2 Traitement par bioaugmentation**

Le principe de la bioaugmentation des sols repose sur l'ajout d'une population monospécifique ou d'un consortium de micro-organismes possédant un potentiel de biodégradation des contaminants supérieur à celui de la microflore indigène du sol. La bioaugmentation peut être utilisée lorsque les micro-organismes ne sont pas présents, en quantité insuffisante ou lorsqu'ils ne possèdent pas le potentiel de dégradation des contaminants.

La bioaugmentation du sol peut être réalisée à l'aide de bactéries. Il existe plusieurs souches bactériennes pures aptes à dégrader les HAP dont *Acinetobacter* sp., *Beijerinckia* sp. et *Pseudomonas* sp. (Cerniglia, 1993). La bioaugmentation à l'aide de micro-organismes de souche pure peut toutefois amener certains inconvénients tels la prédation, la non-adaptation et des conditions environnementales non appropriées à leur développement (Andersson et Henrysson, 1996). Les bactéries peuvent aussi être isolées du sol contaminé et ensuite être réintroduites dans le sol après avoir subi des modifications génétiques ou une activation. L'activation permet de réaliser un inoculum monospécifique ou un consortium par l'ajout du contaminant ciblé à une fraction du sol contaminé dans des conditions non limitantes (nutriments, oxygénation, ...) (Barbeau,

1996). Cette technique, déjà utilisée pour le traitement de sols contaminés par du PCP, pourrait être utilisée pour le traitement d'autres composés xénobiotiques. La bioaugmentation peut aussi être effectuée par l'ajout d'un champignon. Plusieurs études ont montré que les champignons de type carie blanche (*white rot fungi*) sont capables de dégrader une large gamme de composés xénobiotiques, dont les HAP (Bumpus, 1989). Le champignon le plus étudié de cette catégorie est *Phanerochaete chrysosporium*. La non-spécificité du système exo-enzymatique de dégradation de ce champignon laisse envisager un large spectre d'applications industrielles possibles et ce, même si le degré de dégradation varie selon la stabilité chimique des contaminants.

## **2.5 Champignons de type carie blanche (*white rot fungi*)**

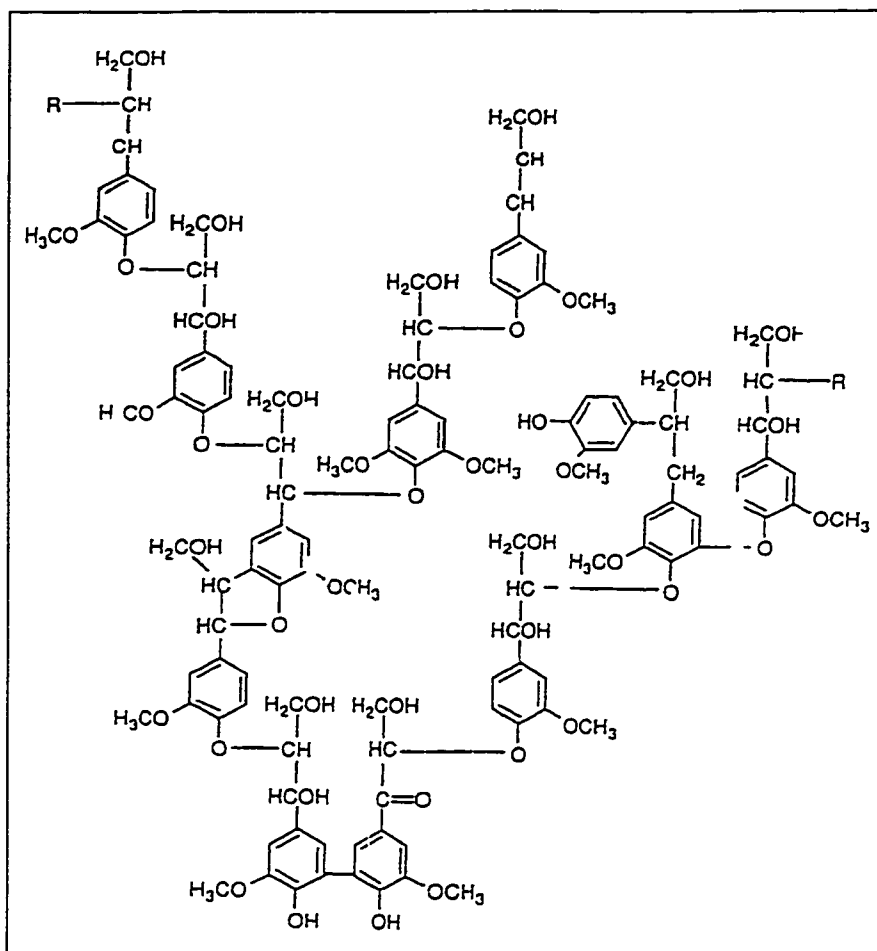
Les champignons de type carie blanche possèdent un mécanisme de dégradation lignolytique qui leur permettent de dégrader des contaminants récalcitrants. La sécrétion d'enzymes extracellulaires (protéases, pectinases, lipases, cellulases, ligninases,...) permet d'effectuer l'attaque enzymatique des composés organiques à l'extérieur de la cellule. Les champignons de type carie blanche ne doivent donc pas incorporer les composés organiques avant de procéder à leur dégradation. L'action de ces enzymes extracellulaires procure un mécanisme par lequel quelques composés organiques sont plus accessibles pour la biodégradation (Bumpus *et al.*, 1985).

### **2.5.1 Dégradation de la lignine par les champignons de type carie blanche**

La lignine, dont la structure moléculaire est présentée à la figure 2.5, est un polymère 3D complexe présent dans le bois. La dégradation de la lignine est compliquée par la présence simultanée de carbones chiraux sous les deux configurations L et D. Sa forme



non régulière la rend très résistante aux lyses enzymatiques. Comme plusieurs composés organiques synthétiques, la lignine est résistante à la dégradation par la plupart des micro-organismes et sa biodégradation est considérée comme l'étape limitante dans le cycle du carbone (Bumpus *et al.*, 1985).



**Figure 2.5: Structure chimique de la lignine (Barr et Aust, 1994).**

Malgré la complexité de la lignine, les champignons de type carie blanche, grâce à leur mécanisme de dégradation non spécifique, sont capables de la dégrader (Barr et Aust, 1994). Ces champignons n'utilisent pas la lignine comme source de carbone pour leur croissance mais la dégradent pour obtenir la cellulose qu'elle contient (Barr et Aust,

1994). Ainsi, comme d'autres organismes dégradeurs, les champignons de type carie blanche ne peuvent utiliser directement les macromolécules complexes comme source de carbone.

La capacité que possède ce type de champignon à dégrader la lignine, et à métaboliser des aromatiques halogénées suggère que d'autres composés organiques plus récalcitrants peuvent aussi être dégradés par ce champignon. Les squelettes carbonés de plusieurs de ces polluants sont en effet comparables à ceux de la structure proposée pour le polymère de lignine (Bumpus *et al.*, 1985).

### **2.5.2 Mécanismes de dégradation utilisés par les champignons de type carie blanche**

Un champignon de type carie blanche, *Phanerochete chrysosporium*, est présentement au coeur de plusieurs recherches sur la biodégradation des xénobiotiques puisque non seulement il dégrade la lignine mais aussi le benzo(a)pyrène et d'autres substances tels 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)éthane, biphenyls polychlorés et lindane (Haemmerli *et al.*, 1986). La figure 2.6 présente une voie métabolique pour la dégradation du benzo(a)pyrène tel qu'étudié par Haemmerli *et al.* (1986). La figure 2.7 présente, quant à elle, la relation entre la ligninase, le peroxyde d'hydrogène, l'alcool véricatrylique et le benzo(a)pyrène tel que modifié par McFarland *et al.* (1992). Ainsi, l'humification (ou la polymérisation) des métabolites formés les rendrait non-biodisponibles, masquant aussi la toxicité du contaminant de départ (May *et al.*, 1997).

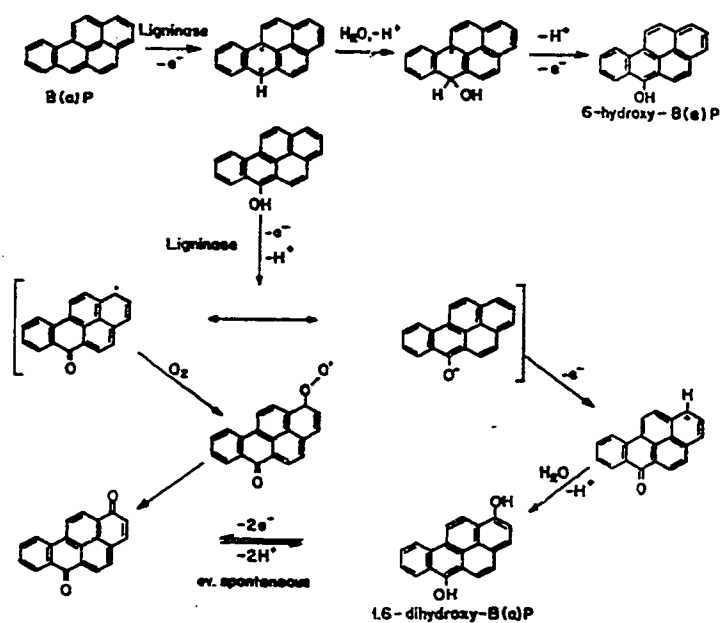


Figure 2.6 : Voie métabolique proposée par Haemmerli *et al.* (1986) pour la dégradation du benzo(a)pyrène par *P. chrysosporium*.

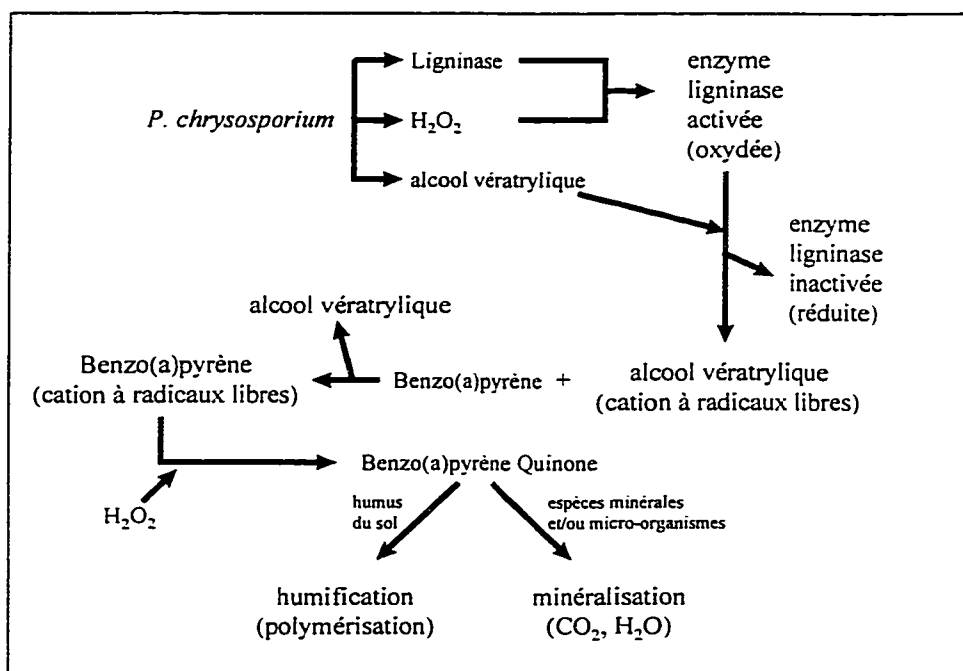


Figure 2.7 : Voie métabolique proposée par McFarland (1992) pour la dégradation du benzo(a)pyrène par *P. chrysosporium*.

La figure 2.7 montre que le champignon sécrète du peroxyde d'hydrogène qui permet l'activation de la ligninase. L'étude du système de dégradation de la lignine par *P. chrysosporium* a montré que la sécrétion du peroxyde d'hydrogène et de la ligninase se produisait uniquement en carence d'azote, d'hydrate de carbone ou de soufre (Bumpus *et al.*, 1985). Un environnement favorable à la production des enzymes extracellulaires, et par conséquent à la dégradation des xénobiotiques, est souvent appelé condition lignolytique (Barr et Aust, 1994).

Une étude réalisée par Dhawale *et al.* (1992) suggère cependant que l'utilisation de *P. chrysosporium* n'est pas limitée aux conditions de carence nutritionnelle. En effet, lors de leurs expériences, le phénanthrène a été dégradé aussi bien en condition lignolytique qu'en condition non lignolytique.

### **2.5.3 Avantages et limite à l'utilisation des champignons de type carie blanche**

La non spécificité du système enzymatique des champignons de type carie blanche est un des avantages associé à leur utilisation dans un programme de biorestauration. La sécrétion des enzymes extracellulaires n'est pas fonction de la concentration, de la nature ou de la présence des contaminants. Les champignons de type carie blanche peuvent donc tolérer une concentration supérieure à celle qui pourrait être toxique pour d'autres micro-organismes. La pression sélective exercée par le contaminant n'est pas un facteur qui initie l'induction des enzymes dans le mécanisme utilisé par les champignons de type carie blanche, la concentration des contaminants peut donc être inférieure à celle nécessaire pour effectuer une dégradation à l'aide des autres micro-organismes. Puisque l'induction des enzymes ne dépend pas de la présence du composé chimique le pré-conditionnement des champignons n'est pas nécessaire. L'utilisation de *P. chrysosporium* dans un traitement laisse donc envisager une plus grande gamme de concentration de

contaminant possible que celle des autres micro-organismes (Bumpus *et al.* 1985). De plus, les substrats nécessaires à la préparation d'un inoculum composé de champignon de type carie blanche, tels les copeaux de bois et les nutriments, ne sont pas coûteux (Barr et Aust, 1994).

Malgré tous ces avantages, la complexité des mécanismes utilisés par les champignons de type carie blanche a ralenti son utilisation pour la biorestauration. Dans certains cas les champignons peuvent limiter la croissance des autres micro-organismes. En effet, ils croissent dans des conditions nutritionnelles limitantes qui ne favorisent pas nécessairement la croissance microbienne. Ces champignons produisent des produits oxygénés très réactifs qui peuvent affecter les autres micro-organismes présents. Ils possèdent aussi la capacité d'ajuster le pH de leur environnement (généralement à la baisse) qui est différent du pH optimum pour les bactéries (Barr et Aust, 1994).

Malgré les désavantages associés à leur utilisation, les champignons de type carie blanche ont la capacité de dégrader les contaminants récalcitrants; ils ont donc un bon potentiel pour restaurer les sols contaminés. Cependant, c'est seulement en comprenant bien les mécanismes utilisés par ces champignons qu'ils pourront être utilisés adéquatement comme technologie de décontamination (Barr et Aust, 1994).

L'efficacité des stratégies de traitement biologique dépend de la nature et des caractéristiques intrinsèques des micro-organismes. Il est donc primordial que les micro-organismes les plus appropriés soient sélectionnés. Ainsi, un biotraitement par l'inoculation de *P.chrysosporium* pourrait procurer un moyen économique et efficace pour la détoxification et la disposition des sols contaminés (Bumpus *et al.*, 1985)

## **2.6 Évaluation de l'efficacité du traitement des sols contaminés**

L'efficacité du traitement des sols contaminés peut être évaluée de deux façons. De façon conventionnelle, l'évaluation de l'efficacité d'un traitement peut être menée par une caractérisation chimique permettant de dresser le bilan massique des contaminants initialement présents (MEF, 1998). L'évaluation de l'efficacité peut être également conduite par une évaluation de la toxicité (MEF, 1998). Ces deux méthodes sont présentées dans les sections suivantes.

### **2.6.1 Suivi chimique**

L'évaluation de l'efficacité d'un traitement a été, jusqu'à tout récemment, toujours accomplie par la quantification massique des contaminants présents (Hamilton *et al.*, 1994; Hund et Traunspurger, 1994). L'utilisation de cette méthode permet de démontrer que les objectifs du traitement ont été atteints, en se basant sur les critères génériques de restauration (MEF, 1998). Cependant, elle nécessite une caractérisation chimique initiale exhaustive pour obtenir avec rigueur l'efficacité réelle du traitement. Les difficultés liées à la restauration basée sur l'évaluation par analyse chimique sont de plusieurs ordres (Hamilton *et al.*, 1994). Tout d'abord, les critères chimiques ne tiennent pas compte des conditions spécifiques du site qui affectent la mobilité et la biodisponibilité du contaminant. De plus cette analyse ne prend pas en considération la complexité de la source et du type de contaminant, l'antagonisme et le synergisme qui peuvent survenir lors d'une contamination mixte. Enfin, les bases d'une analyse par critère chimique sont souvent méconnues, conservatrices et ainsi tendent souvent à la surprotection (Hamilton *et al.*, 1994).

La caractérisation chimique permet uniquement de quantifier la réduction massique des contaminants initialement présents dans le sol. La méthode d'évaluation par l'analyse massique des contaminants est donc insuffisante pour déterminer avec certitude l'efficacité d'un traitement du point de vue détoxification, risque environnemental et santé humaine (Baud-Grasset *et al.*, 1994). En effet, la caractérisation chimique ne donne aucune indication quant à la fraction du contaminant complètement minéralisée par les micro-organismes par rapport à celle transformée en métabolites secondaires. Il est difficile, voir même impossible, de savoir en quels autres composés chimiques les contaminants-parents seront transformés par l'action de la microflore du sol, spécialement dans le cas d'une contamination mixte, et donc de quantifier avec certitude la fraction de composé chimique organique réellement restante après le traitement (Hund et Traunspurger, 1994).

## 2.6.2 Suivi biologique

Afin d'évaluer le risque environnemental associé à la contamination des sols, les agences gouvernementales et la communauté scientifique s'orientent de plus en plus vers l'évaluation écotoxicologique des sols en utilisant des essais de toxicité en combinaison à la caractérisation chimique des sols (Hamilton *et al.*, 1994; Renoux *et al.* 1995). L'essai de toxicité est un outil qui intègre directement l'information biologique au processus d'évaluation, alors que la caractérisation chimique dépend de l'analyse chimique d'échantillons complexes (Callahan et Linder, 1992). Renoux (1995) fait ressortir que l'essai de toxicité permet de détecter la toxicité :

- induite par des composés non détectés lors de l'évaluation chimique;
- des sous-produits de la biodégradation et de leurs métabolites;
- produite par l'augmentation de la biodisponibilité des contaminants;

- causée par les interactions résultant d'une contamination mixte (synergie, antagonisme ou additivité).

Si elle est judicieusement utilisée, une batterie d'essais de toxicité peut être un excellent outil pour suivre les effets écotoxicologiques des contaminants. Étant donnée la complexité écologique du sol, deux voies d'exposition doivent être considérées : 1) par contact direct via les organismes vivants du sol, et 2) par contact indirect via les eaux de ruissellement. Bien que l'exposition par contact direct soit la plus adaptée à la mesure du potentiel toxique des sols (Keddy *et al.*, 1995), il n'existe que peu d'essais de toxicité terrestre par contact direct (ver de terre, croissance et germination de plantes). Ceci limite le choix des niveaux trophiques étudiés et donc la diversité dans la susceptibilité et la sensibilité des organismes pris en compte. L'utilisation de ces organismes dans une batterie d'essais a toutefois l'avantage d'être par contact direct avec le sol (Keddy *et al.*, 1995).

La susceptibilité et la sensibilité des organismes utilisés dans les essais de toxicité sont des facteurs très importants à considérer lors d'une évaluation de la toxicité d'un milieu contaminé. En effet, la susceptibilité des espèces à un contaminant dépend des conditions environnementales présentes lors du test. De plus, certains organismes peuvent être particulièrement sensibles à une substance chimique alors que d'autres ne le sont pas. Ainsi, un mauvais choix peut entraîner une surestimation ou une sous-estimation du potentiel toxique de la matrice étudiée. De plus, les organismes utilisés dans les tests de toxicité doivent être représentatifs de la matrice testée. En ce sens, il est nécessaire de sélectionner des essais de toxicité ayant des niveaux trophiques différents (Keddy *et al.*, 1995). En plus d'être sensibles et reproductibles quant à la prédiction du danger associé à une contamination, les essais de toxicité doivent aussi être peu coûteux, simple et rapide (Reinecke, 1992).



Les essais de toxicité permettent d'établir une relation concentration-réponse, où l'effet toxique s'exprime en fonction de la concentration en contaminant (Renoux, 1995). À l'aide de cette relation il est possible d'obtenir la  $CL_{50}$  (concentration du contaminant pour laquelle une mortalité de 50 % des individus testés est mesurée). Lorsque l'échantillon à tester contient plusieurs contaminants, l'utilisation des essais de toxicité permet d'obtenir un autre type de réponse. Au lieu de déterminer la concentration d'un contaminant qui soit acceptable, les essais de toxicité permettent d'évaluer les effets toxiques des contaminants déjà présents dans le sol (Gibbs *et al.*, 1996). En outre, la dilution du sol à tester afin d'obtenir la  $CL_{50}$  viole l'intégrité du sol en altérant ses caractéristiques, comme les phénomènes d'adsorption, lesquelles influencent la réponse de l'organisme utilisé. Pour cette raison, la communauté scientifique s'oriente de plus en plus vers la détermination du pourcentage d'effet à concentration unique de sol.

La contamination par des xénobiotiques, comme les HAP, stables et récalcitrants de par leur nature, soulève des inquiétudes quant à leur présence dans l'environnement. Ainsi, la possibilité de traiter biologiquement les sols contaminés aux HAP par bioaugmentation ou par biostimulation serait une option avantageuse du point de vue économique et permettrait de maintenir les caractéristiques biologique du sol par rapport à d'autres techniques comme l'incinération. Le nouveau contexte réglementaire amène l'option d'évaluation des risques comme mode de gestion pour la réhabilitation de terrains contaminés. Puisqu'il n'y a pas de lien direct entre la biodégradation et la détoxification, il apparaît que l'évaluation de l'efficacité d'un traitement doit être définie par la combinaison du suivi biologique et chimique.

## CHAPITRE III

### PLAN EXPÉRIMENTAL

---

Ce chapitre décrit le plan expérimental élaboré en vue d'atteindre l'objectif principal du projet, soit d'étudier l'effet d'une bioaugmentation par *P. chrysosporium* et d'une biostimulation sur la détoxification d'un sol contaminé aux HAP en utilisant simultanément un suivi biologique et chimique. Les hypothèses de travail considérées pour l'élaboration du plan expérimental sont les suivantes :

- l'ajout d'une solution nutritive améliore la croissance de *P. chrysosporium*;
- la bioaugmentation d'un sol par *P. chrysosporium* n'améliore pas la minéralisation des HAP;
- les HAP sont transformés par l'action du champignon en métabolites secondaires plus toxiques que le contaminant de départ, et ainsi, la toxicité globale du sol augmente au cours de son traitement;
- la présence du champignon modifie la toxicité du sol;
- les différents amendements (bran de scie, nutriments) jouent un rôle sur l'évolution de la toxicité;
- l'utilisation d'une batterie d'essais de toxicité, judicieusement sélectionnés, permet d'évaluer l'évolution de la toxicité en cours de traitement;
- les essais de toxicité sont des outils pertinents qui corroborent les résultats obtenus d'un suivi chimique.

Le plan expérimental a été séparé en deux phases distinctes. La première étape sert à valider une méthode de préparation de l'inoculum de *P. chrysosporium* servant à bioaugmenter le sol contaminé, elle répond aux deux premières hypothèses de travail. La seconde étape définit les différents traitements appliqués au sol expérimental soumis à une

simulation en réacteur pilote d'une biopile afin de quantifier simultanément l'évolution de la contamination, exprimée en terme de concentration, et l'évolution de la toxicité, exprimée en terme d'effet létal ou souslétal à partir d'essai sur deux espèces sélectionnées. Cette section décrit les choix des traitements étudiées, des essais de toxicité, des contrôles retenus lors de l'élaboration du projet, ainsi que le plan d'échantillonnage suivi pour vérifier les hypothèses de recherche.

### **3.1 Validation d'une méthodologie pour la préparation d'un inoculum de *P. chrysosporium***

La validation de la méthodologie utilisée pour la préparation de l'inoculum de *P. chrysosporium* comporte deux étapes :

- la sélection et la mise en place de la méthodologie utilisée pour la préparation de l'inoculum;
- la réalisation d'essais de biodégradation effectués afin d'étudier l'efficacité de l'inoculum préparé vis-à-vis un contaminant cible.

#### **3.1.1 Sélection et mise en place d'une méthodologie pour la préparation d'un inoculum de *P. chrysosporium***

La sélection et la mise en place d'une méthodologie pour la préparation d'un inoculum est réalisée en trois étapes :

- la sélection de la méthode d'inoculation du sol;
- le choix de la base solide;
- le choix des nutriments ajoutés à la base solide.

Plusieurs types d'inoculation ont été rapportés dans la littérature. Généralement une souche pure du champignon est tout d'abord cultivée sur gélose, puis est transférée sur une

base solide, qui sert à la fois de support physique pour la croissance et de source de carbone. Le champignon sur la base solide constitue l'inoculum qui sert à bioaugmenter un sol contaminé en vue de son traitement. Le transfert du champignon de la gélose à la base solide est un des facteurs les plus importants de l'inoculation, car il conditionne la répliquabilité de l'inoculation. Le meilleur mode de transfert doit donc être sélectionné.

La base solide utilisée comme support pour la croissance de *P. chrysosporium* doit elle aussi être choisie. Plusieurs nutriments peuvent être ajoutés à cette base solide. Pour effectuer le choix de la solution nutritive optimale, une étude comparative de différentes solutions nutritives est réalisée. Le suivi de la propagation du champignon, transféré sur des bases solides contenant respectivement différentes solutions nutritives, conduit au choix de la solution nutritive.

### **3.1.2 Étude de l'efficacité de l'inoculum de *P. chrysosporium* préparé par un essai de biodégradation**

L'essai de biodégradation est effectué pour étudier l'efficacité à dégrader un HAP cible de l'inoculum de *P. chrysosporium* préparé. À cet effet, l'inoculum est incorporé dans un sol contaminé afin d'étudier la dégradation d'un contaminant cible en présence de la matrice complexe que représente le sol. Néanmoins, pour éviter les interactions causées par une contamination mixte, le sol est enrichi artificiellement avec un HAP cible.

Pour étudier la capacité de l'inoculum à dégrader ce HAP cible, deux expériences sont effectuées en parallèle. Pour permettre l'étude de la dégradation complète du contaminant radiomarké, un essai de minéralisation est réalisé. Lors de cet essai les compositions suivantes sont étudiées :

- sol bioaugmenté (inoculum et MSM);
- sol en présence d'agent structurant et de nutriment (bran de scie et MSM);

- sol en présence de nutriment (MSM);
- sol stérilisé bioaugmenté (inoculum et MSM);

La comparaison des traitements avec et sans champignon permet de vérifier la deuxième hypothèse de travail. Ainsi, dans le cas où la biodégradation du phénanthrène par l'action du champignon est inférieure ou égale à celle notée dans le traitement utilisant les micro-organismes indigènes seuls, cette hypothèse serait confirmée. Le premier et le dernier traitement sont tous les deux bioaugmentés avec le champignon, cependant le sol du dernier traitement est préalablement stérilisé. La comparaison de ces deux traitements permet donc de vérifier si la présence combinée du champignon et de la microflore indigène améliore le traitement. Enfin, la comparaison des traitements avec et sans agent structurant permet de vérifier si la présence d'agent structurant modifie la biodégradation de l'HAP étudié.

L'étude de la dégradation globale du contaminant, mesurée par sa caractérisation chimique, est réalisée à l'aide de deux compositions :

- sol bioaugmenté (inoculum et MSM);
- sol en présence de nutriment (MSM).

### **3.2 Évaluation écotoxicologique et chimique associée au traitement biologique des sols contaminés**

L'évaluation écotoxicologique et chimique d'un traitement biologique est réalisée en trois étapes :

- la sélection des traitements étudiés permettant de tester les hypothèses de travail;
- le choix des outils permettant l'évaluation de l'efficacité du traitement autant du point de vue chimique qu'écotoxicologique;
- la mise en place du plan d'échantillonnage.

### 3.2.1 Sélection des traitements étudiés

Afin d'obtenir une relation entre les résultats du suivi écotoxicologique et chimique et les différentes composantes du traitement biologique contrôlé, il est essentiel d'en isoler les principales composantes. Ainsi, afin d'évaluer la détoxification globale du sol contaminé, cinq compositions, réalisées en duplicata, sont étudiées :

**Traitement 1** : sol bioaugmenté (inoculum de *P. chrysosporium* et MSM);

**Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (inoculum de *P. chrysosporium* et MSM);

**Traitement 3** : sol biostimulé (agent structurant et MSM);

**Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM);

**Traitement 5** : sol sans traitement.

De plus, un témoin abiotique est effectué par ajout d'azoture de sodium (0,2 % p/p).

La première composition intègre tout ce qui concerne le traitement d'un sol contaminé par *P. chrysosporium*, avec la participation des micro-organismes indigènes. La deuxième, par la stérilisation du sol contaminé, sépare l'effet du champignon de celui attribué aux micro-organismes indigènes. La troisième et la quatrième composition, permet de vérifier l'effet d'un ajout d'agent structurant et de nutriment. La cinquième composition sert de blanc d'expérience. Elle indique la dégradation des HAP et le potentiel toxique du sol seul, sans aucune influence causée par une bioaugmentation, par un ajout de nutriment ou d'agent structurant.

Les traitements 1 et 2 sont tous les deux bioaugmentés avec le champignon, cependant le sol du deuxième traitement est préalablement stérilisé. Leur comparaison permet de voir si la présence combinée des deux types de micro-organismes améliore ou non le traitement. La seule différence entre les traitements 1 et 3 étant la présence du champignon, leur comparaison permet de voir si la toxicité globale du sol est augmentée

au cours du traitement avec champignon par rapport à celui utilisant les micro-organismes indigènes seuls. La comparaison des traitements 1 et 3 au traitement 5 permet de vérifier si un traitement par bioaugmentation ou par biostimulation améliore la détoxification du sol par rapport au sol sans traitement. Enfin, la comparaison du traitement 3 avec le traitement 4 montre l'effet du bran de scie sur le traitement en terme de biodégradation-détoxification et la comparaison du traitement 4 avec le traitement 5 celui spécifique aux nutriments ajoutés.

### 3.2.2 Analyses effectuées pour évaluer l'efficacité des traitements

Pour évaluer l'efficacité du traitement du point de vue de la concentration globale des contaminants, l'analyse des HAP et des  $C_{10}$ - $C_{50}$  est choisie. En ce qui concerne l'évaluation de la détoxification du sol contaminé, trois essais de toxicité par contact direct avec la matrice de sol sont sélectionnés, soit celui de la mortalité du ver de terre *Eisenia foetida* et de la germination et de la croissance du cresson *Lepidium sativum*. Ces essais ont comme principal avantage leur contact direct avec le sol. De plus, l'utilisation simultanée de ces deux organismes permet l'évaluation écotoxicologique sur des niveaux trophiques différents (Keddy *et al.*, 1995). En plus d'être sensibles et reproductibles quant à la prédiction du danger associé à une contamination, ces essais de toxicité sont relativement peu coûteux, simples et rapides (Reinecke, 1992). L'essai de toxicité Microtox® en phase solide est ajouté afin d'assurer un suivi régulier du potentiel de toxicité du sol au cours de l'expérimentation. Bien que cet essai est réalisé par l'intermédiaire d'une solution aqueuse et qu'il utilise une bactérie ne vivant pas dans le sol; il est simple, rapide, reproductible et permet la pré-évaluation (screening) de la toxicité du sol (Renoux, 1995). De plus, seul de petits volumes de sol sont nécessaires pour réaliser ce test; ce qui augmente son intérêt. Afin d'évaluer l'activité de biodégradation durant l'expérience, des essais de minéralisation avec un composé

radiomarké sont effectués avec des échantillons provenant de chaque traitement. Ainsi, la variation temporelle de l'activité de biodégradation est obtenue.

### 3.2.3 Fréquence des prélèvements

Une étude portant sur le traitement d'un sol contaminé aux HAP par *P.chrysosporium* a indiqué que la durée du traitement dépend de la masse molaire des HAP présents (Haught *et al.*, 1995). Ainsi, cinq semaines après le début d'un traitement par *P. chrysosporium*, la dégradation des HAP de 2 et 3 anneaux aromatiques était complétée. De cette même étude il ressort que pour les HAP de 4 et 5 anneaux, il a fallu environ 15 semaines afin d'atteindre le plateau de dégradation. Baud-Grasset *et al.* (1994) ont quant à eux atteint, par l'application du même type de champignon, une dégradation des HAP de 3 et 4 anneaux supérieure à 70 % après 8 semaines de traitement. En se basant sur ces données, et du fait que la réalisation des essais de toxicité demande environ 3 semaines, l'expérience est réalisée sur une période de 20 semaines.

L'efficacité des traitements est mesurée à quatre reprises au cours de l'expérimentation : aux temps 0, 5, 14 et 20 semaines.



	0	5	14	20
Analyse chimique :				
HAP	✓	✓	✓	✓
C10-C50	✓			✓
Essai de toxicité :				
ver de terre	✓	✓	✓	✓
cresson	✓	✓	✓	✓
Microtox	✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓	✓
Essai de minéralisation :				
traitements (1 à 5)	✓	✓	✓	✓
témoin abiotique (6)	✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓	✓

**Figure 3.1: Schématisation temporelle des analyses effectuées durant l'expérience aux temps 0, 5, 14 et 20 semaines.**

La fréquence des prélèvements et le délai entre chacun d'eux dépend de la caractérisation initiale du sol, i.e. : de la quantité initiale de chaque groupe de HAP (2,3,4 ou 5-6 anneaux), et des résultats du suivi toxique réalisé grâce à l'essai Microtox® effectué toutes les deux semaines. Ces résultats pourront ainsi être un indicatif de la fréquence d'échantillonnage dans le cas où une évolution marquée de la toxicité serait obtenue. Pour s'assurer que le témoin abiotique demeure stérile, le contrôle effectué à l'aide des essais de minéralisation est lui aussi réalisé régulièrement.

## CHAPITRE IV

### MISE EN PLACE D'UNE MÉTHODOLOGIE POUR LA PRÉPARATION D'UN INOCULUM DE *P. chrysosporium*

---

Dans les différentes études rapportées dans la littérature, plusieurs méthodologies sont utilisées pour la préparation d'un inoculum de champignon de type carie blanche tel que *P. chrysosporium* (Bumpus, 1989; Haught *et al.*, 1995; Holroyd et Caunt, 19XX; Lamar et Dietrich, 1990; Lamar et Evans, 1993; McFarland et Qiu, 1995; Tucker *et al.*, 1995). La plupart de ces méthodologies ont une base commune, soit l'utilisation d'une souche pure cultivée sur gélose qui sert à inoculer une base solide. Cette base solide est utilisée à la fois comme support pour la croissance et comme source de carbone pour le champignon. Ces supports sont souvent des grains de maïs, des copeaux de bois ou du bran de scie auxquels est ajouté un mélange nutritif. Malgré le grand potentiel que représente l'utilisation des champignons pour la restauration de sols contaminés par les composés xénobiotiques, peu de détails concernant les quantités de nutriments à ajouter à la base solide utilisée pour la préparation de l'inoculum de *P. chrysosporium* ont été publiés. Pour cette raison, des travaux préliminaires destinés à déterminer les quantités de nutriments nécessaires pour la préparation de l'inoculum ont été réalisés. Ils ont été suivi d'une étude sur l'efficacité de biodégradation de l'inoculum préparé dans un sol contaminé.

## 4.1 Matériel et méthodes

Les sections suivantes présentent la méthodologie utilisée pour la validation de la préparation de l'inoculum de *P. chrysosporium*. Cette dernière est séparée en deux étapes : la sélection du mode de préparation de l'inoculum et la réalisation d'essais de biodégradation afin d'étudier l'efficacité de l'inoculum préparé vis-à-vis d'un contaminant cible.

### 4.1.1 Mode de préparation d'un inoculum de *P. chrysosporium*

La sélection de la méthodologie utilisée pour la préparation de l'inoculum de *P. chrysosporium* a été réalisée en quatre étapes :

- 1) sélection du milieu de culture;
- 2) choix du principe d'inoculation du sol;
- 3) sélection de la base solide utilisée comme support pour la croissance de *P. chrysosporium*;
- 4) choix de la solution nutritive ajoutée à la base solide.

#### 4.1.1.1 Sélection du milieu de culture

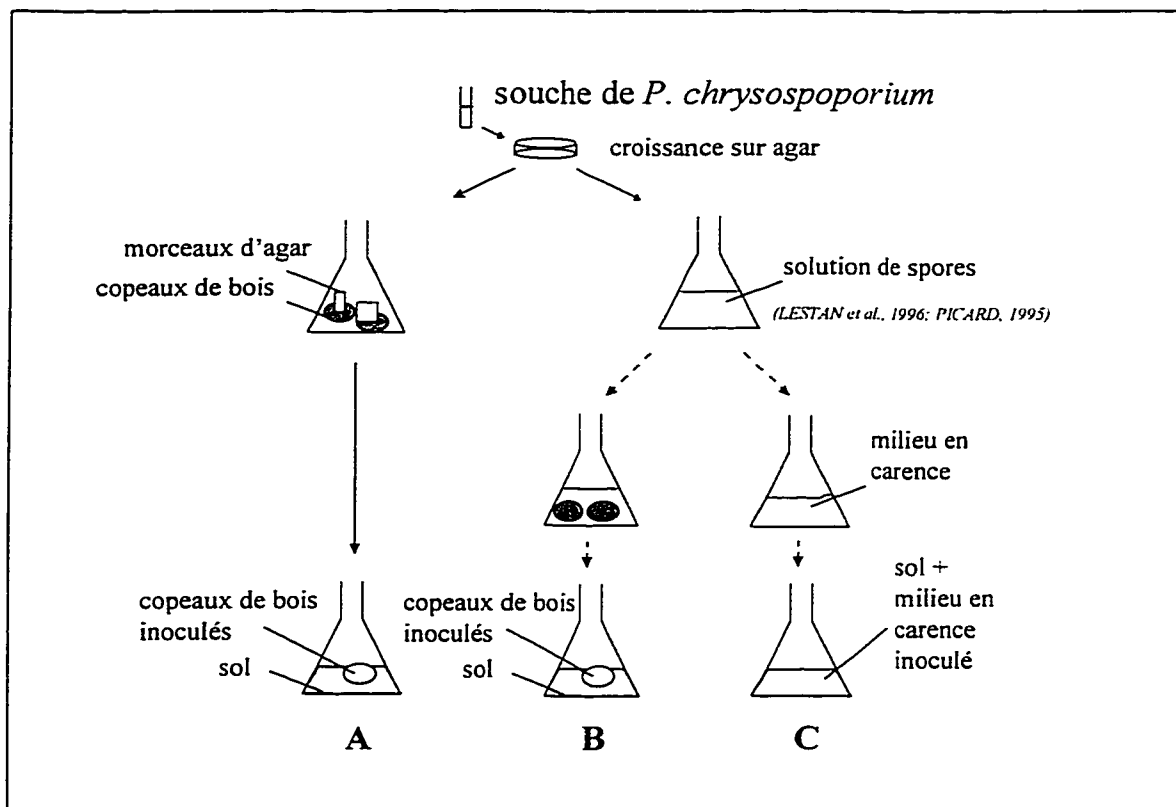
Une étude comparant la croissance du champignon sur deux milieux de culture, utilisés dans la littérature, a été réalisée. Le champignon de type carie blanche utilisé est *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 24725). La souche pure de *P. chrysosporium* a été transférée sur dix géloses de Sabouraud et dix géloses de 2 % d'extrait de malt de manière stérile (*BioKlone2, Microzone Corporation*). Les géloses des deux milieux ont ensuite été incubées à 30° C pendant 1 semaine (*Low Temperature Incubator, Fisher Scientific*) (Picard, 1995).

#### 4.1.1.2 Choix de la méthode d'inoculation du sol

Dans le cadre de la présente étude le champignon sert d'inoculum pour la bioaugmentation d'un sol contaminé en vue de son traitement. Il faut donc choisir le principe d'inoculation qui sera utilisé. Une première analyse a permis de retenir trois méthodes possibles pour l'inoculation du sol. Elles sont illustrées à la figure 4.1.

La méthodologie A est utilisée par plusieurs auteurs (Andersson et Henrysson, 1996; Lamar et Dietrich, 1990). Le sol n'est pas directement inoculé avec le champignon. Ce dernier est tout d'abord transféré sur des copeaux de bois et l'inoculum ainsi réalisé est inséré dans le sol contaminé. La particularité de cette méthodologie est le transfert du champignon aux copeaux de bois. L'inoculation du support solide est réalisée à partir de morceaux d'agar provenant d'une gélose où l'on a fait croître une souche de *P. chrysosporium* dans un incubateur à une température variant de 25 °C à 39 °C pendant 1 semaine (Andersson et Henrysson, 1996; Lamar et Dietrich, 1990).

Le transfert du champignon de la gélose au sol est réalisé par l'intermédiaire d'une solution de spores de concentration connue dans les méthodologies B et C. L'ajout du solution aqueuse sur la gélose permet d'en détacher les spores en effectuant un léger mouvement rotatif. Dans la méthodologie B la solution de spores est utilisée pour inoculer une base solide (copeaux de bois) et l'inoculum ainsi constitué est utilisé pour bioaugmenter le sol. Dans la méthodologie C, une fraction de la solution de spores est transférée dans un milieu en carence, permettant la libération des enzymes du système de dégradation lignolytique du champignon. Suite à l'incubation de ce milieu, il serait possible d'inoculer le sol.



**Figure 4.1: Méthodes pouvant être utilisées pour la préparation d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Bien que la méthodologie A soit utilisée par plusieurs auteurs, elle apparaît peu répliquable. En effet, l'inoculation des copeaux de bois est réalisée avec des morceaux d'agar. La concentration du champignon sur les copeaux de bois dépend donc de l'uniformité de sa croissance sur l'agar. La qualité de l'inoculum préparé peut ainsi varier d'une inoculation à l'autre. Dans le cadre de la présente étude il est important de sélectionner une méthode d'inoculation répliquable. En effet, l'inoculation du sol doit être réalisée à plusieurs reprises (duplicat et triplicat) et la comparaison de ces réplicats repose sur l'uniformité de l'inoculation. Dans les méthodologies B et C, l'utilisation d'une solution de spores permet de dépasser cette limite. En effet, il est possible d'évaluer la concentration de spores par spectrophotométrie et ainsi de réaliser une inoculation répliquable. Dans la méthodologie C, aucun support pour la croissance du champignon n'est disponible alors que dans la méthodologie B des copeaux de bois sont utilisés. La

méthodologie B est donc sélectionnée puisqu'elle permet une inoculation répliquable et qu'elle offre un support pour la croissance du champignon.

#### **4.1.1.3 Choix de la base solide**

Pour réaliser la croissance des champignons de type carie blanche plusieurs substrats solides peuvent être utilisés, tels des grains de maïs et de riz, des copeaux de bois ou du bran de scie (Barr et Aust, 1994). Ces bases solides présentent l'avantage d'être peu dispendieux, et de constituer une source de carbone facilement utilisable pour combler les besoins du système ligno-enzymatique de ces champignons.

Le choix de la base utilisée a reposé sur la facilité de manipulation, la disponibilité et l'aspect économique. Des trois substrats proposés, le bran de scie d'érable standardisé (2-4,75 mm) (*École Polytechnique*) est sélectionné comme support pour la croissance de *P. chrysosporium*.

#### **4.1.1.4 Choix des éléments nutritifs à ajouter à la base solide**

Tel que mentionné au début du présent chapitre peu de détails concernant les éléments nutritifs ajoutés à la base solide sont accessibles dans la littérature. Une étude a par conséquent été réalisée pour approfondir ce point. En se basant sur la méthodologie B présentée à la figure 4.1, plusieurs éléments nutritifs ont été utilisés pour produire des solutions de spores à différentes teneur en carbone, en azote et en phosphore. Le choix de la concentration des différents composés est basé sur les concentrations utilisées dans la littérature en milieu liquide (Picard, 1995; Kirk *et al.*, 1978). La concentration des différentes solutions nutritives utilisées sont présentées au tableau 4.1. Afin de choisir la meilleure solution nutritive, le suivi de la propagation du champignon, transféré sur des bases solides contenant respectivement les différentes solutions nutritives, a été effectué.

**Tableau 4.1: Solutions nutritives utilisées pour l'inoculation du bran de scie servant de support pour la croissance de *P. chrysosporium***

Description	Concentration
solution de glucose	10,08 g/L
solution d'amidon	10,08 g/L
solution d'azote	1,58 g/L
solution de phosphate	0,83 g/L (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 3,7 g/L (Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Milieu favorisant la croissance de <i>P. chrysosporium</i> (MFC) (d'après PICARD, 1995 et Kirk <i>et al.</i> , 1978)	C/N/P = 10,08/1,58/0,2 g/L voir annexe B
eau distillée	--

Toutes les manipulations ont été réalisées de manière stérile sous une hotte biologique (*BioKlone2, Microzone Corporation*). La croissance d'une souche de *P. chrysosporium* (ATCC 24725) a tout d'abord été réalisée sur un milieu composé de 2 % malt agar à 30 °C (*Low Temperature Incubator, Fischer Scientific*) pendant 1 semaine pour tous les essais (Andersson et Henrysson, 1996; Lestan *et al.*, 1996). L'ajout des différentes solutions nutritives sur les géloses permet d'en détacher les spores en effectuant un léger mouvement rotatif. La concentration en spores des différentes solutions ainsi réalisées a été évaluée à l'aide d'une mesure par spectrophotométrie (*Model 390, Sequoia-Turner*) (à 650 nm une absorbance de 0,5 correspond à  $2,5 \times 10^6$  spores/ml) (Kirk *et al.*, 1978). Le bran de scie standardisé (2-4,75 mm), utilisé comme support pour la croissance du champignon, a été préalablement stérilisé (121 °C, 1,1 kg/cm<sup>2</sup> pour 30 min.). Cette opération a été réalisée dans des erlenmeyer de 1 L et une quantité de 5 g de bran de scie a été choisie afin d'obtenir un ratio surface oxygénée/épaisseur la plus grande possible. Ensuite, les brans de scie des différents erlenmeyers ont été respectivement inoculés par les différentes solutions de spores de façon à obtenir une concentration constante de  $4,5 \times 10^5$  spores/g de bran de scie (Lestan *et al.*, 1996). Les brans de scie inoculés ont par la suite été incubés à 30 °C (*Low Temperature Incubator, Fischer Scientific*).

Le choix du meilleur élément nutritif est basé sur des observations visuelles consignées selon une échelle de rang de la propagation du mycelium, complétées par des observations au microscope (40X et 100X, *Type 104, Nikon*). Dans la littérature, l'incubation de la base solide inoculée (ci après nommé inoculum) est réalisée sur une période de 1 semaine. Ainsi, après une période d'incubation fixe (1 semaine), des observations ont été faites sur chacun des brans de scie inoculés.

#### **4.1.2 Activité de biodégradation de *P. chrysosporium* sur un sol contaminé**

Les sections suivantes présentent les principales manipulations qui ont été effectuées en vue d'évaluer l'activité de biodégradation de *P. chrysosporium* sur un sol contaminé. Le détail des manipulations qui ne se trouvent pas dans cette section est présenté en annexe.

##### **4.1.2.1 Préparation de l'inoculum**

Suite à la sélection du milieu de culture, de la méthode d'inoculation du sol, de la base solide utilisée et de la solution nutritive à ajouter à la base solide, présentée à la section 4.1.1, la préparation de l'inoculum peut être réalisée.

La préparation de l'inoculum a donc été réalisée de la façon suivante. Toutes les opérations sont effectuées sous une hotte biologique afin de prévenir la contamination des échantillons. Le champignon de type carie blanche utilisé est *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 24725). Le champignon est tout d'abord cultivé sur gélose de Sabouraud à 30 °C pendant une semaine (Picard, 1995). Suite à l'incubation, l'ajout de la solution nutritive MFC (voir annexe B) (Kirk *et al.*, 1978; Picard, 1995) sur le milieu de culture permet d'en détacher les spores en effectuant un léger mouvement rotatif. La concentration de la suspension de spores ainsi préparée est évaluée par



spectrophotométrie (*Model 390, Sequoia-Turner*) ( $\lambda = 650$  nm, une absorbance de 0,5 correspond à  $2,5 \times 10^6$  spores/ml) (Kirk *et al.*, 1978). Préalablement à l'inoculation du bran de scie d'érable standardisé, ce dernier est stérilisé ( $121^\circ\text{C}$ ,  $1,1 \text{ kg/cm}^2$  pour 30 min.). Après le refroidissement du bran de scie (température ambiante), la suspension de spores y est ajoutée à l'aide de pipettes stérilisées de 1 et 5 ml (*Fisherbrand*) de façon à obtenir une concentration finale de  $4,5 \times 10^5$  spores/g<sub>humide</sub> (Lestan *et al.* 1996). L'inoculum est alors incubé à  $30^\circ\text{C}$  pendant une semaine (*Low Temperature Incubator, Fischer Scientific*).

#### 4.1.2.2 Enrichissement artificiel d'un sol par du phénanthrène

Le sol sélectionné possède deux principales caractéristiques : il est initialement non contaminé et a une texture sablonneuse. Ce sol provient d'un boisé situé à Blainville, région où l'on retrouve des sols possédant ces deux caractéristiques.

Le HAP cible sélectionné pour l'enrichissement artificiel du sol doit posséder les caractéristiques suivantes :

- représenter l'ensemble des HAP en étant peu volatil et peu soluble;
- être biodégradable par les micro-organismes présents dans le sol;
- être minéralisé de façon significative de façon à obtenir une différence marquée entre les différents traitements.

Les HAP de 2 anneaux sont exclus étant donné leur plus grande volatilité (tension de vapeur de 11 960 mPa pour le naphthalène comparativement à 90,7 mPa pour le phénanthrène, à  $91,3 \cdot 10^{-6}$  mPa pour le pyrène et  $0,37 \cdot 10^{-6}$  mPa pour le benzo(a)pyrène (tableau 2.2)). Ceux possédant 5-6 anneaux sont eux aussi exclus étant donné que les taux de minéralisation escomptés ne sont pas assez importants pour obtenir une réponse quant aux divers traitements (Qiu et McFarland, 1991). Enfin, les HAP de 4 anneaux,

dont le pyrène, ont un taux de minéralisation moins important même par des micro-organismes indigènes adaptés à la contamination (Deschênes, 1995). Ainsi, le phénanthrène représentant bien les HAP de 3 anneaux a été sélectionné. En effet, il possède une volatilité (90,7 mPa) et une solubilité (1,29 mg/L eau) représentative de l'ensemble des HAP. De plus, il est généralement biodégradé par les micro-organismes du sol (environ 45 % de minéralisation dans un sol contaminé par des résidus agés de créosote) (Deschênes, 1995).

L'enrichissement a été effectué par la vaporisation (vaporisateur commercial de 30 ml en HDPE) d'une solution de 1,6 mg de phénanthrène/ml méthanol (méthanol : qualité > 99,9 %, *Anachemia*; phénanthrène : qualité > 96 %, *Sigma*) sur le sol (< 4,75 mm) pour atteindre une concentration finale de 100 mg de phénanthrène/kg de sol. Une quantité totale de 3 600 g de sol (6 x 600 g) a ainsi été artificiellement contaminé. Le contenu en eau du sol a été initialement ajusté à 30 % (base humide) afin de faciliter la répartition du contaminant. Une fraction du sol (300 g) a été étendue sur une surface en pyrex afin d'obtenir une couche d'environ 1 cm d'épaisseur. Suite à la vaporisation, le sol a été mélangé à l'aide d'une spatule en acier inoxydable et mis de côté. La fraction restante (300 g) du sol a reçu le même traitement. Les 600 g de sol ont ensuite été mélangés pendant 10 minutes pour obtenir une matrice homogène. Enfin, 3 heures ont été allouées pour l'évaporation du méthanol et de l'eau ajoutée.

#### **4.1.2.3 Analyse chimique du phénanthrène dans le sol artificiellement contaminé**

Toutes les analyses sont effectuées par un laboratoire externe certifié (Technitrol-ECO). L'analyse chimique du phénanthrène est basée sur la méthode 8270 (EPA, 1998c) modifiée en mode SIM (*Selective Ion Monitoring*). L'échantillon de sol est homogénéisé et séparé en deux fractions, la première servant à la détermination du contenu en eau et la seconde pour la quantification massique des HAP. L'extraction du phénanthrène contenu dans le

sol est réalisée à l'aide d'une solution acétone:dichlorométhane (20:80) en utilisant une sonde à l'ultra-son selon la méthode 3550 (EPA, 1998a). La purification de l'échantillon est réalisé par chromatographie en perméation de gel selon la méthode 3640 (EPA, 1998b). L'analyse de l'extrait est ensuite effectuée par GC-MS en mode SIM.

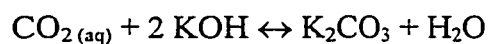
#### **4.1.2.4 Biodégradation du phénanthrène en présence de *P. chrysosporium***

Afin d'étudier la capacité de l'inoculum préparé à dégrader le phénanthrène, deux expériences ont été effectuées en parallèle :

- 1) essais de minéralisation pour permettre l'étude de la dégradation complète du phénanthrène;
- 2) essais de biodégradation pour permettre le suivi de la concentration résiduelle en phénanthrène.

##### **4.1.2.4.1 Minéralisation du phénanthrène**

L'essai de minéralisation est une analyse qualitative qui sert à vérifier le potentiel que possède les micro-organismes à dégrader un contaminant cible. Le test repose sur la minéralisation du contaminant, qui est mesurée par sa dégradation ultime en CO<sub>2</sub>. Le contaminant marqué au carbone 14 (<sup>14</sup>C) est mis en contact avec le sol étudié dans des bouteilles sérologiques de 125 ml munies d'une trappe à CO<sub>2</sub> (tube de verre de 5 ml contenant 1 ml d'une solution de KOH 1M). La minéralisation est alors mesurée par la production de <sup>14</sup>C-CO<sub>2</sub>, lequel a réagi avec la solution de KOH, selon la réaction chimique suivante :



Périodiquement, le KOH (qualité = 85-92 %, *Anachemia*), dans lequel le  $^{14}\text{CO}_2$  est piégé, est prélevé pour analyse et remplacé par une solution fraîche. Les échantillons de KOH (2 ml) sont mélangés à un cocktail à scintillation (10 ml) (OptiPhase Hisafe 3, *Fisher Scientific*) et analysés dans un compteur à scintillation (Wallac 1409, *Fisher Scientific*).

L'injection initiale du composé radiomarké ( $^{14}\text{C}$ ) est effectuée de manière à obtenir 100 000 dpm/microcosmes. Ensuite les microcosmes sont immédiatement scellés et incubés à 20 °C à l'obscurité afin de prévenir la photodégradation des contaminants. De façon à évaluer les pertes abiotiques du composé radiomarké, des témoins abiotiques, réalisés par l'ajout de 0,2 % p/p d'azoture de sodium (qualité = 99 %, *Anachemia*), sont réalisés pour chaque série étudiée.

Le test de minéralisation effectué en microcosme permet d'évaluer l'effet d'une bioaugmentation par *Phanerochaete chrysosporium* sur la biodégradation d'un HAP modèle ( $^{14}\text{C}$ phénanthrène). Pour ce faire, quatre compositions, réalisées en triplicat, sont étudiées :

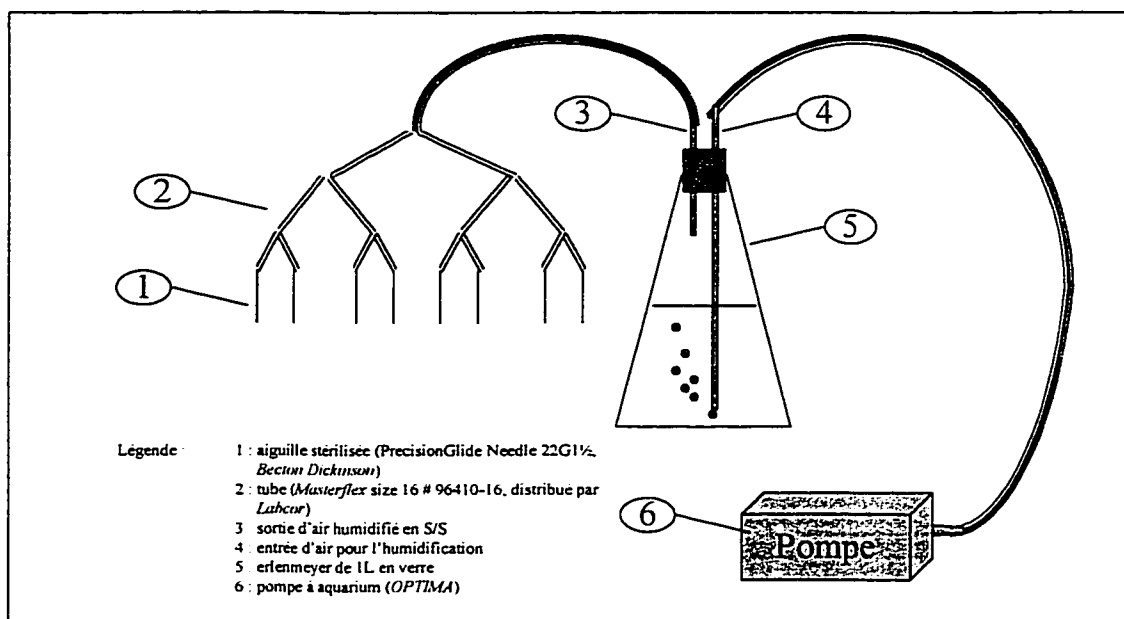
- 1) sol en présence de nutriment (MSM);
- 2) sol en présence d'agent structurant et de nutriment (bran de scie et MSM);
- 3) sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur un support de bran de scie et MSM);
- 4) sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur un support de bran de scie et MSM).

De plus, un témoin abiotique (0,2 % p/p  $\text{NaN}_3$ ) est ajouté à chacune de ces compositions.

Chaque microcosme contient 20 g de sol enrichi artificiellement en phénanthrène (100 mg/kg) dont le contenu en eau a été ajusté à 25 % en utilisant une solution nutritive MSM (Davis *et al.*, 1993; McFarland *et al.*, 1995) et contient 100 000 dpm de phénanthrène (13,3 mCi/mmol, *Sigma*) radioactif. La composition du MSM est présentée à l'annexe B. Le sol de la quatrième composition a été préalablement stérilisé par

a été effectué selon le ratio maximum (10 % v/v de sol) recommandé dans la *Politique de réhabilitation des terrains contaminés* (MEF, 1988).

L'inoculum utilisé étant affecté par l'oxygénation, une aération minimale des microcosmes est effectuée au taux de 150 ml/min pendant 5 min à chaque prélèvement (McFarland *et al.*, 1995). La figure 4.2 présente le système utilisé pour l'aération des microcosmes. L'air est tout d'abord acheminé à un erlenmeyer de 1 L contenant de l'eau distillée pour son humidification à l'aide d'une pompe (*Optima*). L'air humidifié est ensuite divisé en 8 afin d'obtenir le taux d'aération désiré. Notons que la quantité de radioactivité présente dans le volume mort du microcosme est évaluée avant l'aération pour éviter toute perte.



**Figure 4.2 : Système d'aération des microcosmes pour l'essai de minéralisation.**

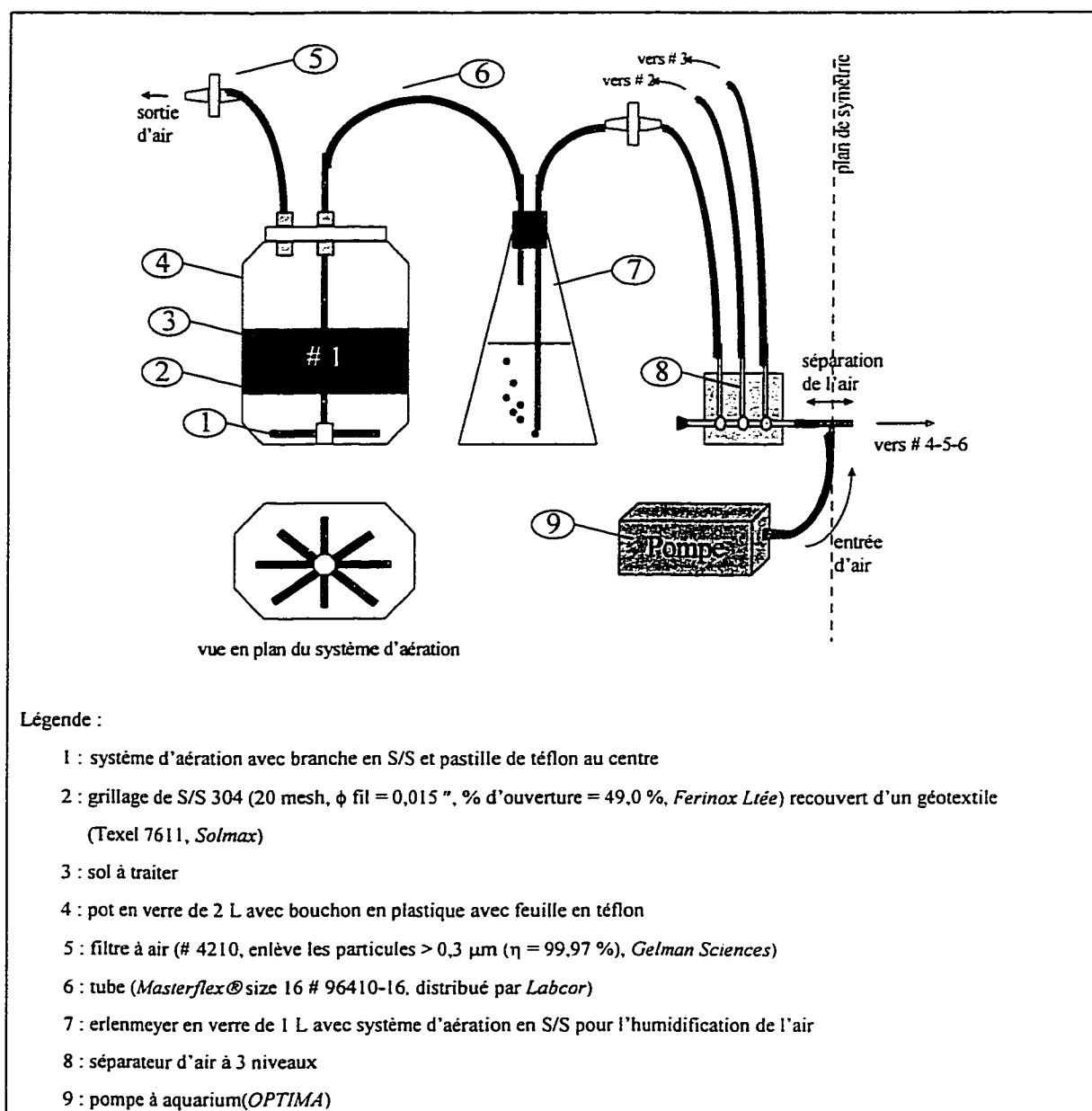
#### 4.1.2.4.2 Suivi de la concentration du phénanthrène

L'effet d'une bioaugmentation par *Phanerochaete chrysosporium* est aussi étudié en microcosmes de 2 L en verre par le suivi de la concentration en phénanthrène par des analyses chimiques. Deux compositions en duplicats ont été étudiées, soit la bioaugmentation par *P. chrysosporium* et la biostimulation par l'ajout de MSM des micro-organismes indigènes du sol. De plus un témoin abiotique est ajouté à chaque composition (0,2 % p/p NaN<sub>3</sub>). Des échantillons de 450 g d'un sol enrichi en phénanthrène (100 mg/kg) et humidifié à 25 % avec du MSM constituent la base des compositions étudiées. Comme pour les essais de minéralisation la bioaugmentation a été réalisée selon le ratio 10 % v inoculum/v de sol. La période d'incubation de 54 jours a été appliquée à 20 °C.

Trois échantillons composites ont été prélevés après 0, 14 et 54 jours d'incubation et leurs analyses chimiques ont été réalisées par un laboratoire externe (voir section 4.2.1.3). L'oxygénation étant requise pour le développement du champignon utilisé, une aération semi-continu à 25 ml/min toutes les 8 heures pendant ½ heure est effectuée (basé sur l'aération standard des biopiles de 0,1 m<sup>3</sup>d'air/m<sup>3</sup>sol/h) (Samson, 1996).

La figure 4.3 présente un schéma du montage utilisé. L'air est tout d'abord acheminé à un erlenmeyer de 1 L contenant de l'eau distillée pour son humidification à l'aide d'une pompe (*Optima*). L'air humidifié entre dans le microcosme de 2 L fermé hermétiquement et est réparti sur toute la surface du sol à traiter à l'aide du système d'aération. Ce dernier est situé au fond du microcosme et est composé de 8 branches de 5 cm (S/S), où sont placés 4 trous de 1 cm de diamètre, reliés par une pastille en téflon. Le sol est maintenu en place à l'aide d'un grillage de S/S 304 (20 mesh, *Ferinox Ltée*) recouvert d'un géotextile (Texel 7611, *Solmax*). Enfin, l'air sortant du microcosme est filtré à l'aide d'un filtre à air (# 4210, enlève les particules > 0,3 µm (η = 99,97 %), *Gelman Sciences*)

afin de prévenir la contamination des espaces de travail du laboratoire par les spores du champignon.



**Figure 4.3 :** Description schématique du montage utilisé lors de l'essai de biodégradation en microcosmes de 2 L.

## 4.2 Résultats et discussion

Les sections suivantes présentent les principaux résultats qui ont été obtenus lors de l'évaluation de l'activité de biodégradation de *P. chrysosporium* sur un sol contaminé. Certains des résultats bruts sont présentés en annexe.

### 4.2.1 Sélection du milieu de culture

Une étude comparant la croissance du champignon sur deux milieux de culture, utilisés dans la littérature, a été réalisée. Les deux milieux de culture comparés sont une gélose de Sabouraud et une composée de 2 % d'extrait de malt.

Suite à l'incubation de 1 semaine, une première observation a permis de constater que la croissance du champignon était plus importante sur le milieu Sabouraud. Des solutions de spores ont ensuite été réalisées par l'ajout de la solution nutritive MFC sur chaque gélose. La solution de spores provenant du milieu Sabouraud était plus uniforme et plus concentrée. Le milieu Sabouraud a donc été sélectionné pour cultiver *P. chrysosporium*.

### 4.2.2 Choix des éléments nutritifs à ajouter à la base solide

Afin de choisir la solution nutritive optimale, le suivi de la propagation du champignon, transféré sur des bases solides contenant respectivement les différentes solutions nutritives, a été effectué.

Le tableau 4.2 présente les résultats de cette étude. La propagation du mycelium sur le bran de scie y est consignée selon une échelle de rang (nd, +, ++, +++). La présence de spores a aussi été observée au microscope.



**Tableau 4.2: Observation qualitative de la propagation du champignon sur le support solide (bran de scie) en présence de différentes solutions nutritives après 1 semaine d'incubation**

Solution nutritive utilisée	Observation					
	Propagation du mycelium sur le bran de scie (visuel)				Présence de spores et de mycelium (microscope)	
	<i>nd</i>	+	++	+++	<i>oui</i>	<i>non</i>
<i>glucose</i>	✓					✓
<i>amidon</i>	✓					✓
<i>azote</i>			✓		✓	
<i>phosphate</i>	✓					✓
<i>MFC</i>				✓	✓	
<i>eau distillée</i>	✓					✓

nd : non-déecté

+: présence faible

++ : présence moyenne

+++ : présence élevée

Les résultats montrent que seule la solution nutritive à base d'azote et celle basée sur le milieu favorisant la croissance de *P. chrysosporium* (MFC) favorise la croissance du champignon sur le bran de scie utilisé. Dans le premier cas, après un temps d'incubation de 1 semaine à 30 °C, une mince couche de mycelium recouvre entièrement la surface des brans de scie. La croissance est effective sur la presque totalité des brans de scie mais plus particulièrement sur le contour de ceux-ci. Pour ce qui est du bran de scie inoculé en présence de la solution nutritive MFC, dans les mêmes conditions d'incubation, une couche de mycelium recouvre ici aussi entièrement la surface des brans de scie. Cependant, la croissance y est plus importante qu'en présence de la solution contenant uniquement de l'azote.

La propagation du champignon est plus importante sur le bran de scie contenant le milieu nutritif MFC. Ce milieu nutritif est donc sélectionné pour effectuer la préparation de l'inoculum.

### 4.2.3 Homogénéité du sol de départ

L'analyse des concentrations initiales en phénanthrène dans les différents échantillons de départ (microcosmes) peut donner une indication quant à l'homogénéité de l'enrichissement du sol. Le tableau 4.3 présente les concentrations initiales des 6 microcosmes, la concentration moyenne entre les microcosmes, l'écart-type et le coefficient de variation de la mesure. Le coefficient de variation obtenu est inférieur à 10 %. Étant donné que cette variation est à la fois fonction de l'hétérogénéité de l'enrichissement et de la reproductibilité de l'analyse chimique, une telle valeur est jugée acceptable. Ainsi, le sol de départ est considéré homogène à travers l'ensemble des microcosmes.

**Tableau 4.3 : Concentration de phénanthrène dans le sol artificiellement contaminé (mg/kg de sol sec)**

Méthode d'insertion de la contamination	Échantillons						Résultats statistiques		
	1	2	3	4	5	6	concentration moyenne (mg/kg)	écart-type entre les réplicats (mg/kg)	coefficient de variation de la mesure (%)
vaporisation	110	106	114	100	95	104	104.8	6.8	6.5
	valeur attendue :						100,0	< 10,0	< 10,0

$C_i$  = Concentration de phénanthrène dans les 6 échantillons analysés

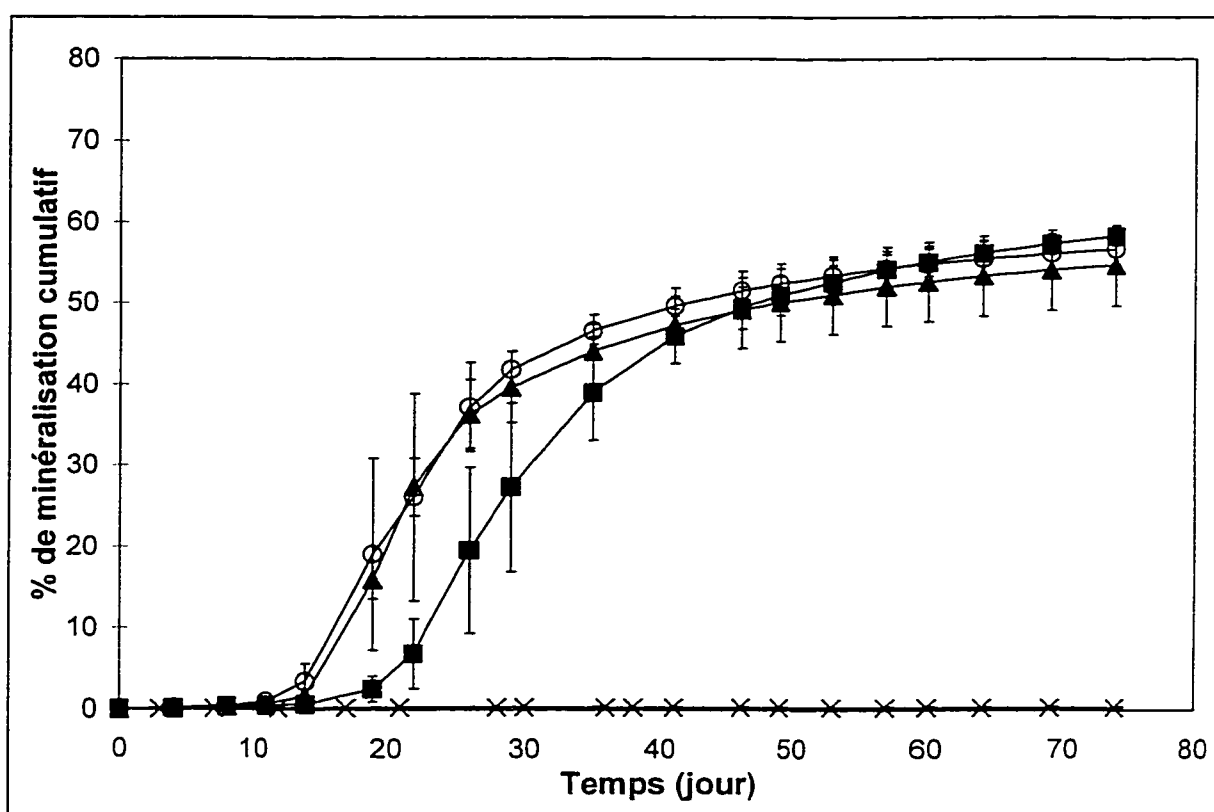
$C_m$  = Concentration moyenne =  $\sum C_i / 6$

écart-type (é.t.) =  $\sqrt{(6 \sum C_i^2 - (\sum C_i)^2) / (6 \cdot (6-1))}$

coefficient de variation (C.V.) = é.t./ $C_m$  · 100 %

### 4.2.4 Minéralisation du phénanthrène

La figure 4.4 présente les résultats de l'essai de minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène. Quelque soit le type de traitement appliqué, la minéralisation atteint environ 55 % après 50 jours. Par contre, le temps de latence varie d'un traitement à l'autre.



**Figure 4.4 : Minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène dans un sol artificiellement contaminé.** ■ Traitement par bioaugmentation (*P. chrysosporium* sur un support de bran de scie et MSM), ▲ Traitement par biostimulation avec agent structurant (bran de scie et MSM), ○ Traitement par biostimulation (MSM), × Traitement par bioaugmentation avec sol préalablement stérilisé et ■ témoin abiotique. (Les résultats représentent la moyenne de trois réplicats et les barres d'erreur l'écart-type des réplicats).

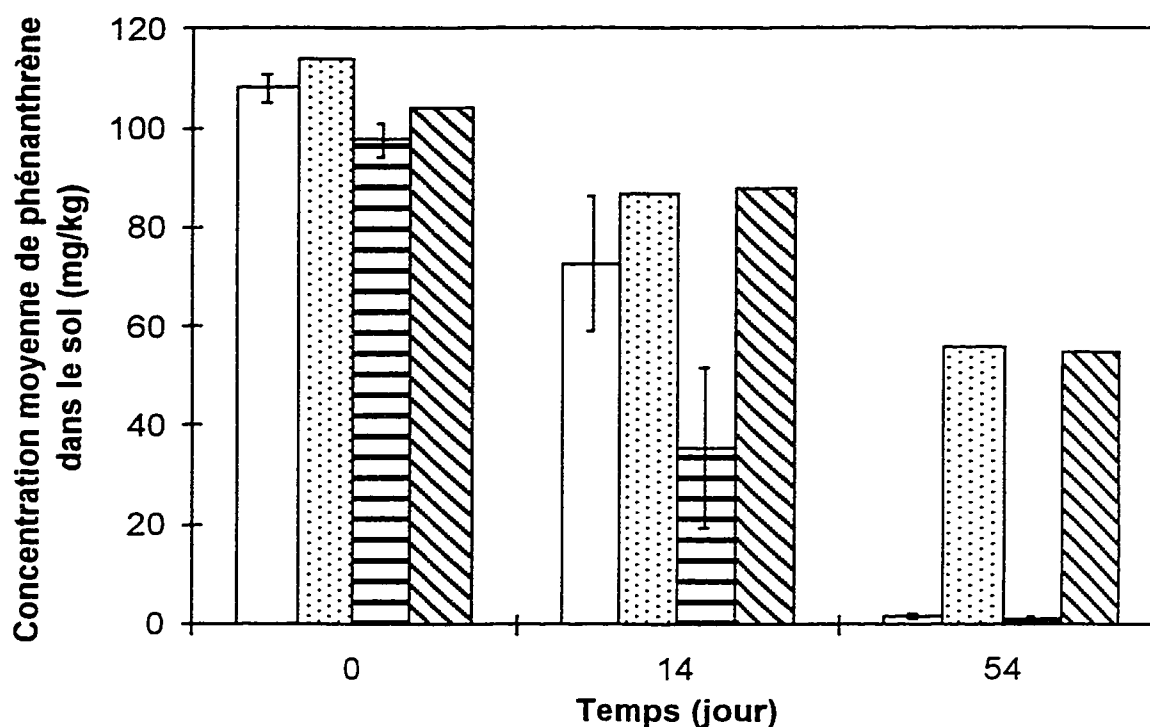
La latence est d'environ 10 jours pour le traitement par les micro-organismes indigènes du sol avec amendement ou non d'agent structurant, alors qu'elle est d'environ 13 jours pour le traitement par bioaugmentation. Le temps de latence obtenu peut être causé par l'enrichissement du sol en phénanthrène. En effet, réalisé à l'aide d'un vecteur de méthanol, cette contamination artificielle peut engendrer un effet stressant sur la flore indigène du sol.

L'ajout de bran de scie comme agent structurant ne semble pas affecter la dégradation du phénanthrène par les micro-organismes indigènes si on la compare à la minéralisation obtenue avec le sol seul. Cependant, l'ajout d'un inoculum composé de *P. chrysosporium* sur bran de scie semble avoir un effet négatif transitoire. En effet, après 20 jours la minéralisation moyenne du phénanthrène est inférieure à 5 % dans le traitement par bioaugmentation (champignon) alors qu'elle est de 15 % dans le traitement par biostimulation (MSM et bran de scie). La minéralisation obtenue durant le traitement par bioaugmentation pourrait être dû au champignon, aux micro-organismes indigènes du sol ou une interaction entre ces derniers. Le contrôle effectué à l'aide d'un sol tout d'abord stérilisé et ensuite bioaugmenté avec le champignon montre qu'après 28 jours aucune minéralisation n'est encore visible, bien que la propagation du champignon soit constaté (mycelium blanc). Les résultats obtenus de ce contrôle montre que la non-spécificité du champignon ne se traduit pas nécessairement par des propriétés de minéralisation. Comme le rapporte Barr et Aust (1994), les champignons de type carie blanche en relation avec les autres micro-organismes peuvent optimiser la dégradation de certains contaminants. En effet, certains contaminants peuvent être toxiques pour les bactéries même si celles-ci possèdent les enzymes nécessaires pour leur dégradation. Barr et Aust (1994) suggèrent que les champignons de type carie blanche grâce à leur système enzymatique non spécifique (les monooxygénases), peuvent amorcer la dégradation des polluants présents en réduisant leur toxicité vis-à-vis des bactéries. Ultérieurement les

bactéries poursuivent la dégradation des produits intermédiaires jusqu'à dégradation complète des contaminants (Barr et Aust, 1994).

#### 4.2.4.1 Suivi de la concentration du phénanthrène

Les résultats obtenus des analyses chimiques sont présentés à la figure 4.5



**Figure 4.5 : Biodégradation du phénanthrène dans un sol artificiellement contaminé.** □ Traitement par bioaugmentation (inoculum de *P. chrysosporium*) et ■ témoin abiotique, ▨ Traitement par biostimulation (nutriment) avec ▩ témoin abiotique. (Les résultats représentent la moyenne de deux répliquats et les barres d'erreur l'écart-type des répliquats).

On y constate, tout comme pour les essais de minéralisation, que la présence de *P. chrysosporium* apporte un effet transitoire négatif mais n'affecte pas la réponse finale. En effet, après 14 jours la concentration en phénanthrène est de 35 mg/kg sol sec dans le

sol traité avec une solution nutritive (MSM) alors qu'elle est d'environ 70 mg/kg sol sec dans le traitement avec champignon.

Ces résultats montrent qu'à un temps intermédiaire, la dégradation est deux fois moins importante en présence du champignon. Néanmoins, à la fin de la période d'incubation de 54 jours, la concentration de phénanthrène dans le sol avec ou sans champignon est pratiquement la même (1,4 et 1,1 mg/kg sol sec respectivement). Le ralentissement de la biodégradation du phénanthrène en présence de *P. chrysosporium* semble donc être un phénomène transitoire.

### 4.3 Conclusions

En résumé, les principales conclusions qui peuvent être tirées des résultats obtenus dans le présent chapitre sont :

- la croissance de *P. chrysosporium* sur un support de bran de scie est plus importante lorsqu'une solution nutritive y est ajoutée;
- l'enrichissement artificiel d'un sol par l'ajout de phénanthrène dans une solution de méthanol est homogène lorsqu'on ajuste le contenu en eau initial du sol;
- l'ajout de champignon au sol contaminé à un taux de 10 % v/v apporte un effet transitoire négatif sur la biodégradation du phénanthrène;
- le phénanthrène est rapidement minéralisé par la microflore indigène du sol malgré l'enrichissement artificiel du sol;
- la présence du champignon a un effet sur l'action des micro-organismes indigènes;
- la bioaugmentation du sol artificiellement contaminé par *P. chrysosporium* n'améliore pas la minéralisation du phénanthrène.

## CHAPITRE V

# EFFET DE LA BIOAUGMENTATION ET DE LA BIOSTIMULATION SUR LA DÉTOXICATION D'UN SOL CONTAMINÉ AUX HAP

---

Ce chapitre présente l'étude réalisée sur l'évaluation de la détoxification d'un sol contaminé aux HAP lors de son traitement. Dans le cadre de cette étude, divers traitements biologiques ont été réalisés. L'évolution de la toxicité du sol contaminé a ainsi été évaluée après bioaugmentation du sol par un inoculum de *P. chrysosporium* ou après sa biostimulation par l'ajout de nutriments et d'un agent structurant. De plus, des traitements ont été effectués en parallèle afin de relier l'évolution de la toxicité aux diverses composantes de ces deux traitements (présence d'agent structurant, de nutriments ou du champignon).

L'évolution de la toxicité a été évaluée à quatre reprises à l'aide d'essai par contact direct avec la matrice de sol, soit par l'essai de mortalité du ver *Eisenia foetida* et par l'essai de germination et de croissance du cresson *Lepidium sativum*. Un suivi temporel a également été effectué grâce à l'essai Microtox® en phase solide sur la bactérie luminescente *Vibrio fischeri*. De façon à compléter l'analyse écotoxicologique, une caractérisation chimique du sol (HAP, C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>) a également été effectuée. De plus, des essais de minéralisation ont été réalisés afin d'effectuer le suivi du potentiel de minéralisation dans les différents traitements.

## 5.1 Matériel et méthodes

La section suivante présente la méthodologie analytique suivie pour vérifier les hypothèses de l'étude. Le détail des manipulations qui ne se trouve pas dans cette section est présenté en annexe.

### 5.1.1 Sol contaminé à l'étude

La sélection du sol contaminé repose sur trois principaux critères. Une réponse toxique initiale doit être détectée, la concentration en HAP doit rendre possible l'obtention de résultats d'analyses chimiques significatifs et le sol doit contenir une microflore possédant le potentiel de dégradation des HAP.

Le sol sélectionné provient de la sablière Thouin, située à l'est de Montréal (voir figure 5.1). Cette sablière a été utilisée entre les années 1966 et 1968 comme site illégal d'élimination de déchets industriels. Elle est répertoriée par le MEF comme un site orphelin d'élimination de déchets dangereux de catégorie 1 (GERLED). Ce site a fait l'objet d'une étude de faisabilité relative à l'utilisation de la biodégradation comme technique de traitement des sols contaminés (IAF *et al.*, 1996). Les résultats de cette étude montrent que ce site possède des caractéristiques qui le rend intéressant pour l'étude de l'évolution de la toxicité lors d'un biotraitement.

La zone contaminée couvre une superficie d'environ 35 000 m<sup>2</sup>. La contamination est limitée aux sables de surface, dont l'épaisseur varie de 1 à 3 m, et ne semble pas pénétrer l'argile sous-jacente. Cependant, la nappe phréatique se retrouve généralement à moins de 50 cm de la surface du sol ce qui la rend vulnérable à la contamination présente dans les sols sus-jacents.



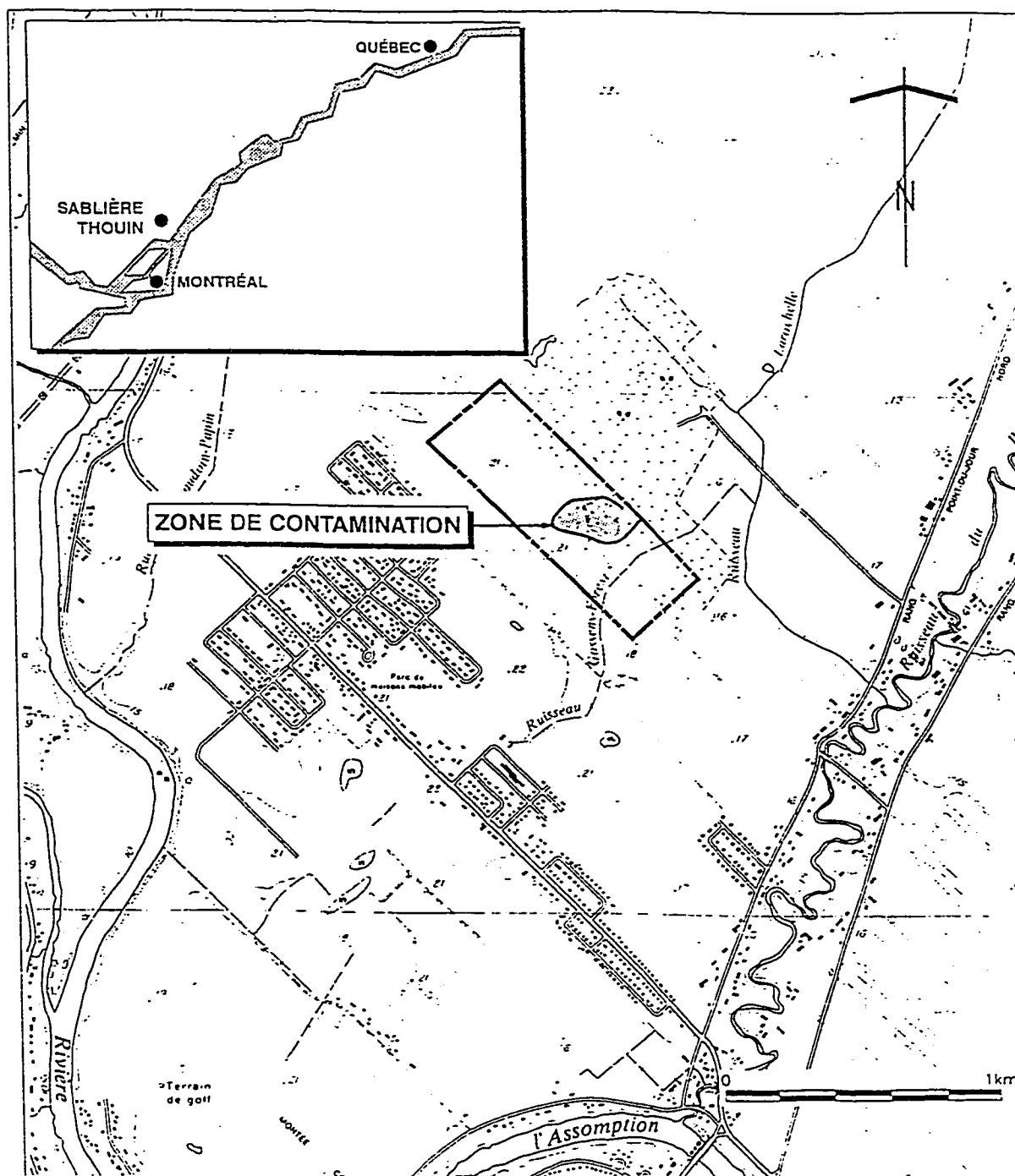


Figure 5.1: Emplacement de la sablière Thouin (d'après IAF *et al.*, 1996).

Un échantillonnage préliminaire, basé sur les caractérisations antérieures du site, a été effectué avec l'aide du personnel du MEF. Des essais préliminaires en laboratoire de minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène (voir méthodologie utilisée à la section 5.1.5) ne démontrant aucune activité de biodégradation en raison d'un pH de l'ordre de 10, ce point d'échantillonnage a été rejeté. Une deuxième campagne d'échantillonnage, menée sur 3 zones de contamination répondant aux exigences prédéfinies et dont le pH était près de la neutralité a alors été effectuée. Suite à la caractérisation chimique des HAP (voir méthodologie utilisée à la section 5.1.4) des échantillons prélevés et à un essai de minéralisation avec un HAP cible, soit le  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène, l'une des zones a été sélectionnée. La caractérisation initiale des différentes zones est présentée en annexe.

Seule la couche située à une profondeur comprise entre 5 et 20 cm de la surface a été échantillonnée. L'échantillonnage de la zone contaminée sélectionnée a été effectué après l'élimination de la couche supérieure. L'ensemble du sol recueilli (200 L) a ensuite été tamisé (< 5 mm), puis homogénéisé à l'aide d'outils (pelle, râteau, bêche) sur le site même. Pour éviter la contamination des sols de surfaces, l'homogénéisation du sol tamisé a été réalisée sur une surface de polyéthylène placée à proximité de la zone échantillonnée. Le sol étant très humide, une période de séchage (environ 1h30) a été alouée afin d'abaisser le contenu en eau avant la dernière homogénéisation. Le sol a été de nouveau homogénéisé avant son transfert dans les chaudières de 20 L en HPDE (*Dominium & Grimm inc.*) utilisées pour son transport.

## 5.1.2 Traitements étudiés

Les traitements suivants, définis au chapitre 3, ont été étudiés :

**Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM);

**Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM);

**Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM);

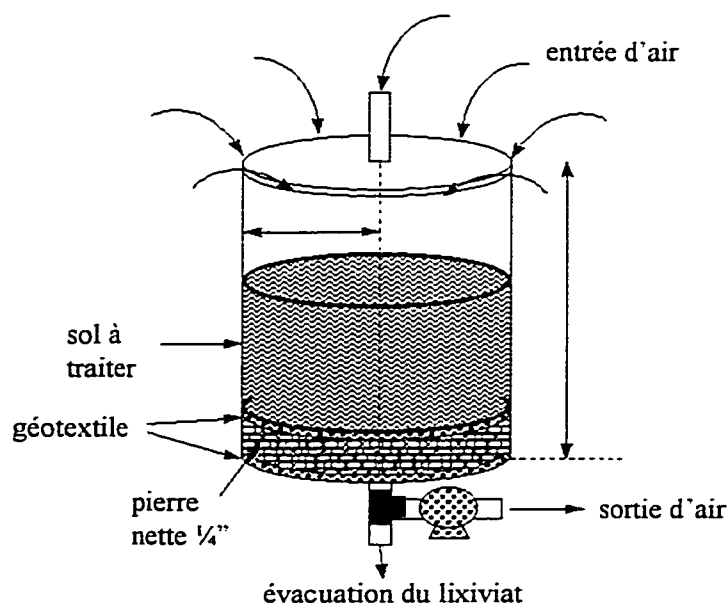
**Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM);

**Traitement 5** : sol sans traitement.

De plus, un témoin abiotique a été effectué par ajout d'azoture de sodium (0,2 % p/p) (qualité = 99 %, *Anachemia*).

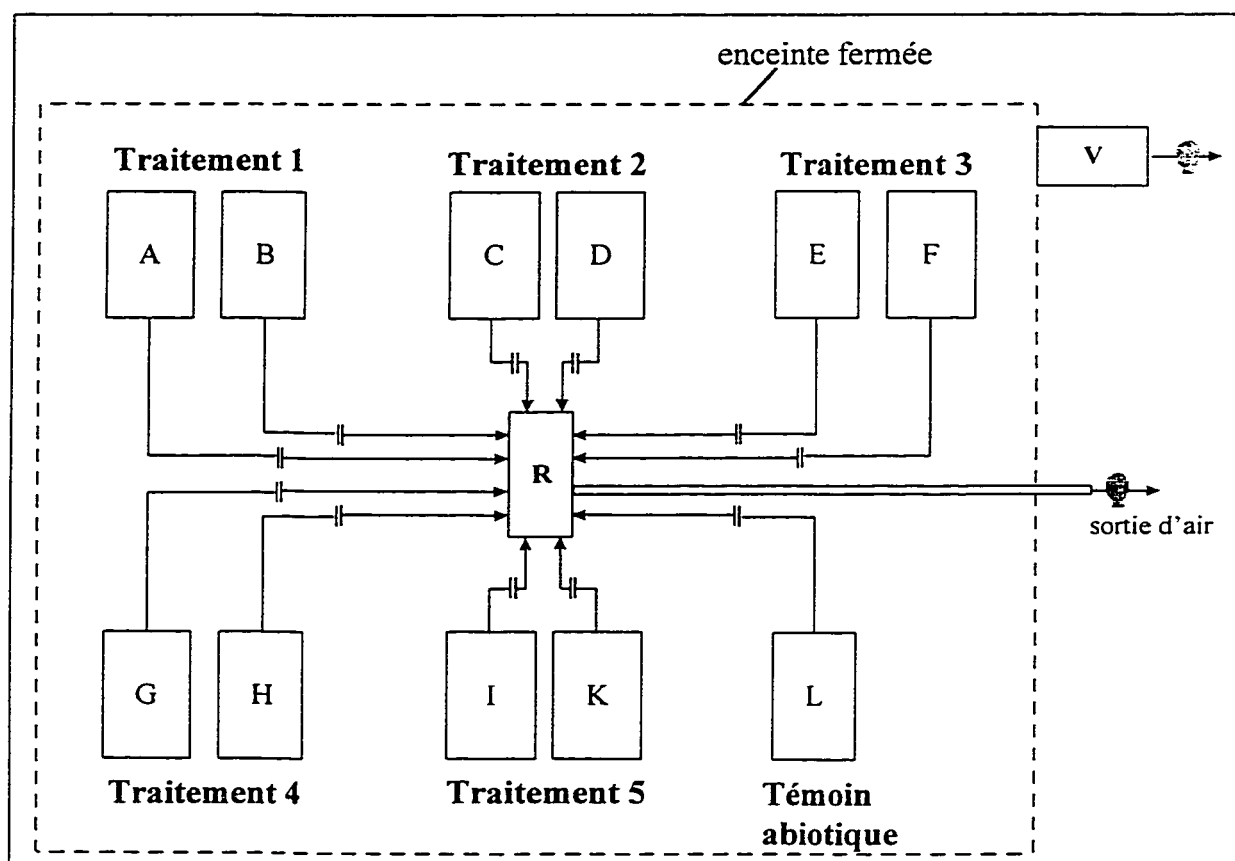
### 5.1.2.1 Réacteur à lit fixe

Le réacteur à lit fixe conçu permet d'étudier les cinq traitements sélectionnés. Étant donné la nature de la contamination du sol, l'étude des différents traitements est échelonnée sur une période de 4 mois (section 3.2.3). La conception des réacteurs est donc basée sur une mise à l'échelle réduite d'une biopile et non sur l'optimisation d'une configuration à l'échelle du laboratoire. Les réacteurs utilisés lors de l'étude sont donc des sections de la biopile réelle et l'aération est réalisée à un taux minimum de  $0,1 \text{ m}^3$  d'air/ $\text{m}^3$  de sol/heure (Samson, 1996). Un schéma des réacteurs est présenté à la figure 5.2. Les réacteurs à lit fixe ont un volume de 20 L et ils sont fabriqués en HDPE (*Dominium & Grimm inc.*) ( $H = 14 \text{ ''}$ ,  $\Phi = 6 \text{ ''}$ ). Ils ne sont pas fermés hermétiquement mais sont tout simplement recouvert d'un couvercle (*Dominium & Grimm inc.*) de façon à ne pas limiter l'entrée d'air. L'aération est exercée par pression négative à l'aide d'une pompe à vide (*École Polytechnique*). Son suivi est réalisé à l'aide d'un débitmètre à bulle (25 ml, *Lurex*). De façon à uniformiser l'aération une couche de 1'' de pierre nette de 1/4'' recouvre le fond du réacteur. Un géotextile non tissé (TX 6111, *Solmax*) sépare la pierre nette du sol à traiter. L'évacuation du lixiviat est réalisée par gravité en enlevant la pince en polypropylène (05-869, *FisherBrand*) placée à la sortie du réacteur.



**Figure 5.2: Réacteur utilisé en laboratoire pour effectuer les traitements biologiques contrôlés.**

La figure 5.3 présente une vue globale des réacteurs utilisés (11). Afin de limiter les variations du taux d'aération à travers l'ensemble des réacteurs, un contenant répartiteur a été utilisé. Ce répartiteur assure l'uniformité de l'aération. Des connecteurs (6150-0010,  $\frac{1}{4}$ " à  $\frac{5}{16}$ ", *Nalge Nunc International*), placés entre la sortie des réacteurs et le contenant répartiteur, permettent de brancher le débitmètre à bulle servant à évaluer le débit d'aération. De plus, afin de réduire les risques de contamination de l'air du laboratoire, les réacteurs ont été placés dans une enceinte fermée en polyéthylène. Un ventilateur (QT-110 (110 cfm), *Nutone*) permet, par pression négative, d'acheminer l'air de l'enceinte à une hotte chimique et ainsi évite la contamination de l'air ambiant.



**Figure 5.3: Vue d'ensemble de tous les réacteurs dans l'enceinte fermée. Répartiteur (R); Ventilateur (V); Connecteur (||).**

L'uniformité de l'aération a été évaluée à l'aide d'un essai de traceur. L'argon radioactif ( $\text{Ar}^{41}$ ) étant un gaz inerte il a été choisi comme traceur. Deux réacteurs ont été utilisés dans l'essai de traceur : le premier contenait du sol dont le contenu en eau a été ajusté à 25 %, le deuxième contenait du sol amendé avec du bran de scie (10 % v/v) dont le contenu en eau a aussi été ajusté à 25 %.

L'argon a été activé dans le réacteur nucléaire de l'École Polytechnique de Montréal. Le débit a été ajusté à  $0,1 \text{ m}^3 \text{ d'air/m}^3 \text{ de sol/heure}$ . Afin de prévenir l'absorption de l'argon sur les particules de sol, l'essai a débuté par un rinçage de 40 minutes avec de l'argon non-radioactif (*Air Liquide*). L'argon radioactif (sol seul : activité spécifique initiale de

0,40 mCi/mmol; sol et bran de scie : activité spécifique initiale de 0,34 mCi/mmol) (environ 7 ml) a ensuite été injecté à l'entrée du réacteur. Huit détecteurs (*EGNE Ortec*) calibrés, placés à l'entrée (4) et à la sortie (4) du réacteur, ont permis de mesurer les impulsions électriques correspondantes aux rayons gamma émis par l' $\text{Ar}^{41}$ . La figure 5.4 montre l'emplacement des détecteurs.

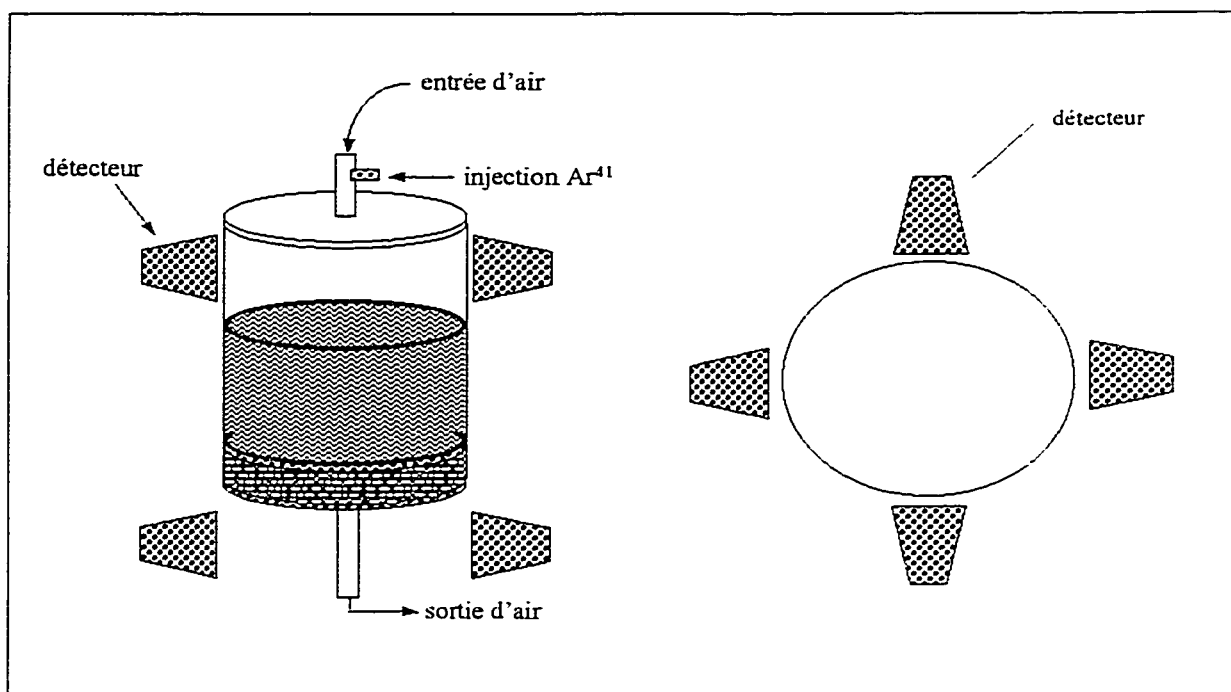


Figure 5.4: Emplacement des détecteurs utilisés pour l'essai de traceur.

### 5.1.2.2 Préparation des traitements et paramètres opératoires

Chaque réacteur contient initialement 12 kg de sol contaminé. Pour les réacteurs correspondant aux traitements 1, 2, 3 et 4 le contenu en eau a été ajusté à 25 % (p/p) en utilisant un milieu minéral salin (MSM) (Davis *et al.*, 1993; McFarland *et al.*, 1995). La composition du MSM est présentée à l'annexe B. Le contenu en eau du traitement 5 (sol sans traitement), a été maintenu à sa valeur initiale soit à 21 %. L'ajout de l'inoculum (traitement 1 et 2), fourni par *Biogénie inc.* et défini à la section suivante, et du bran de

scie (traitement 3) a été effectué selon le ratio maximum (10 % v/v) recommandé dans la *Politique de réhabilitation des terrains contaminés* (MEF, 1988). Le sol du traitement 2 a été préalablement stérilisé par irradiation à l'aide de rayon gamma (1,33 MeV) émis par une source de  $\text{Co}^{60}$  (50 KGy, *Nordion International*). Le sol de chaque réacteur a été homogénéisé manuellement préalablement à chacun des amendements.

### 5.1.2.3 Inoculum de *P. chrysosporium* utilisé

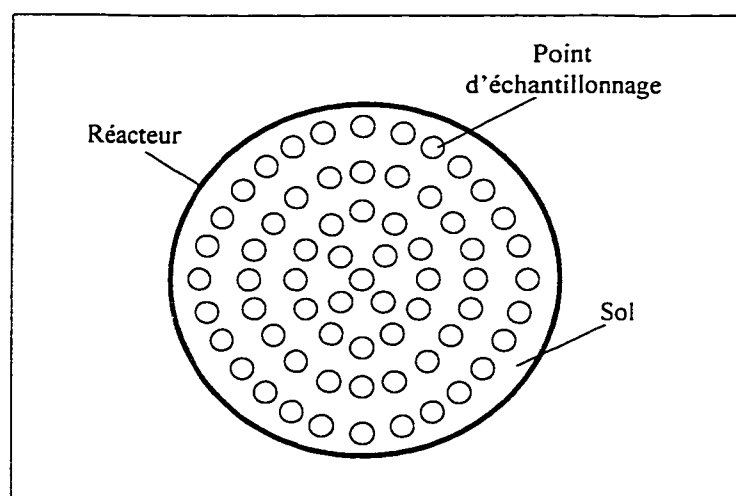
En raison du volume important requis pour réaliser la bioaugmentation, la préparation de l'inoculum de *P. chrysosporium* a été gracieusement réalisée par *Biogénie inc.* La méthodologie utilisée pour la préparation de l'inoculum est similaire à celle utilisée pour les expériences antérieures (section 4.1.2.1). Les informations concernant la préparation de l'inoculum fournies par *Biogénie inc* sont les suivantes :

- la souche de champignon est tout d'abord mise en culture sous agitation et aération;
- 10 % v/v de ce milieu de culture est ajouté à du bran de scie de bois franc standardisé préalablement stérilisé et la croissance est réalisée pendant plusieurs semaines jusqu'à obtention d'un inoculum actif (test sur pétri de poly-R) (voir section 5.1.7);
- la croissance de l'inoculum est effectuée avec aération dans l'obscurité à 20 °C dans des réacteurs en acier inoxydable (S/S) de 8 L. Une couche de pierre nette au fond du réacteur assure la répartition de l'air.

### 5.1.2.4 Échantillonnage des réacteurs à lit fixe et conservation des échantillons

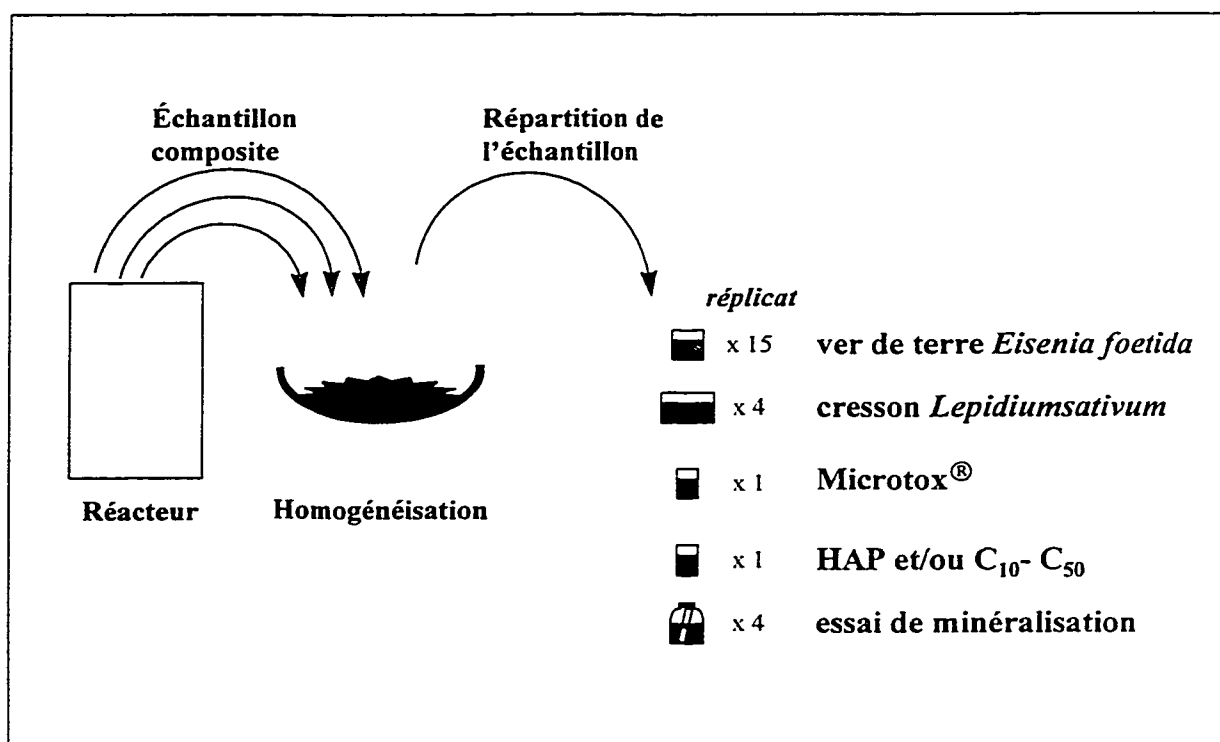
L'échantillonnage des réacteurs est effectué selon une stratégie de quadrillage afin d'être représentatif de l'ensemble du volume de sol (figure 5.5). Bien que cette méthode soit la meilleure stratégie pour considérer le réacteur entier, elle ne tient pas compte de la

variabilité spatiale de la contamination du sol au sein du réacteur. Pour contrer cette limite, le sol de chaque réacteur est entièrement homogénéisé avant le début de l'expérience. Chaque sous-échantillon de l'échantillon composite est prélevé à l'aide d'un échantillonneur (Modèle GC-1, Code 1159, *Geneq inc.*) et le tout est homogénéisé à l'aide d'une spatule en acier inoxydable avant la répartition de l'échantillon composé dans les contenants respectifs pour les diverses analyses (figure 5.6). Les échantillons prélevés entre les points d'échantillonnage fixés (0, 5, 14 et 20 semaines) pour analyses chimiques subséquentes sont conservés à - 20 °C dans des contenants fournis par le laboratoire externe (MEF n° 410-HYD. 1.0). Les échantillons prélevés aux points d'échantillonnage fixés pour les analyses immédiates (essais de toxicité sur le ver de terre, sur le cresson et Microtox®; analyses chimiques des HAP et des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>; essais de minéralisation) sont conservés à 4 °C pour une durée de moins de 4 jours. L'échantillon composite provenant du témoin abiotique est uniquement utilisé pour fin d'analyse chimique et d'essais de minéralisation.



**Figure 5.5: Stratégie systématique d'échantillonnage utilisée pour un prélèvement représentatif de l'ensemble du volume de sol. (65 sous-échantillons).**





**Figure 5.6 : Préparation d'un échantillon pour les essais de toxicité, les analyses chimiques et l'essai de minéralisation.**

### 5.1.3 Essais de toxicité

Les sections suivantes présentent la méthodologie utilisée pour la réalisation des essais de toxicité. Les essais utilisant le ver *Eisenia foetida* et le cresson *Lepidium sativum* ont été réalisés dans un laboratoire externe accrédité (Technitrol-ECO).

#### 5.1.3.1 Essai de mortalité sur le ver *Eisenia foetida*

Le protocole utilisé est basé sur la méthode publiée par l'EPA (1989), et mesure par un test statique de 14 jours, soit la létalité (toxicité aiguë) des sols sur le ver *Eisenia foetida*. Chaque échantillon à tester est constitué de 600 g de sol sec répartis en 15 répliquats de

40 g dont le contenu en eau est ajusté à 75 % de la capacité de rétention en eau par ajout d'eau déionisée. Chaque réplicat contient deux vers, d'un poids variant de 300 à 500 mg, déposés dans le contenant perforé à la surface où se trouve l'échantillon à tester. Tous les échantillons de sol sont placés à la lumière continue (600 Lux) dans une chambre où la température est maintenue à  $20 \pm 2$  °C. Après 7 jours et 14 jours, les vers sont dénombrés et les pourcentages de mortalité calculés par rapport au sol témoin. Le témoin est composé d'un sol artificiel, constitué de 40 % de silice (tamis 40 mesh), de 30 % de silice (tamis 24 mesh), de 20 % de kaoline et de 10 % de tourbe, et est utilisé comme contrôle de qualité. Ce témoin permet d'évaluer la sensibilité de l'organisme testé et ainsi permet de s'assurer de sa constance entre les quatre essais effectués (0, 5, 14 et 20 semaines). Le pentachlorophénate de sodium est utilisé comme toxique de référence. L'essai de mortalité sur le ver *Eisenia foetida* est réalisé à une concentration unique (100% de sol contaminé à l'étude). Les résultats sont rapportés de la façon suivante :

$$\% \text{ de mortalité} = \frac{(\text{nombre de ver mort/nombre total de ver exposé})_{\text{sol testé}}}{(\text{nombre de ver mort/nombre total de ver exposé})_{\text{sol témoin}}}$$

### 5.1.3.2 Essai de germination et de croissance sur le cresson *Lepidium sativum*

Le protocole utilisé est basé sur la méthode ISO 11269-2, et mesure la germination et la croissance du cresson *Lepidium sativum* dans un test statique de 16 jours. Chaque échantillon à tester est constitué de 520 g de sol sec répartis en 4 réplicats de 130 g dont le contenu en eau est ajusté à 55 % de la capacité de rétention en eau par ajout d'eau déionisée. Pour effectuer l'essai, dix graines de cresson sont déposées dans chaque réplicat expérimental. Tous les échantillons de sol sont placés à l'obscurité pour un délai variant de 2 à 3 jours dans une chambre thermostatée ( $24 \pm 2$  °C). Si après 2 jours une germination est notée sur plus de 50 % des graines, la photopériode (4 500 Lux) est automatiquement ajustée à 16 heures d'illumination suivies de 8 heures d'obscurité. Dans le cas contraire, l'ajustement de la photopériode débute après le troisième jour.

Après un délai de 4 jours, les graines de cresson germées sont dénombrées visuellement et les pourcentages de germination calculés par rapport au sol témoin. Après une exposition totale de 16 jours, la croissance est évaluée en dénombrant les graines de cresson développées et en mesurant la biomasse de la plante poussée (poids sec) par rapport au sol témoin. Le témoin est composé d'un sol artificiel, constitué de 50 % de silice (40 mesh), de 25 % de silice (24 mesh), de 20 % de kaoline et de 5 % de tourbe, et est utilisé comme contrôle de qualité. Le chlorure de mercure est utilisé comme toxique de référence. L'essai de germination et de croissance sur le cresson *Lepidium sativum* est réalisé à une concentration unique (100% de sols contaminés à l'étude). Les résultats sont rapportés de la façon suivante :

$$\% \text{ de germination} = \frac{(\text{nombre de graine germée/nombre total de graine exposée})_{\text{sol testé}}}{(\text{nombre de graine germée/nombre total de graine exposée})_{\text{sol témoin}}}$$

$$\% \text{ d'émergence} = \frac{(\text{nombre de graine/nombre total de graine exposée})_{\text{sol testé}}}{(\text{nombre de graine/nombre total de graine exposée})_{\text{sol témoin}}}$$

$$\% \text{ de biomasse totale} = \frac{(\text{poids plante poussée})_{\text{sol testé}}}{(\text{poids plante poussée})_{\text{sol témoin}}}$$

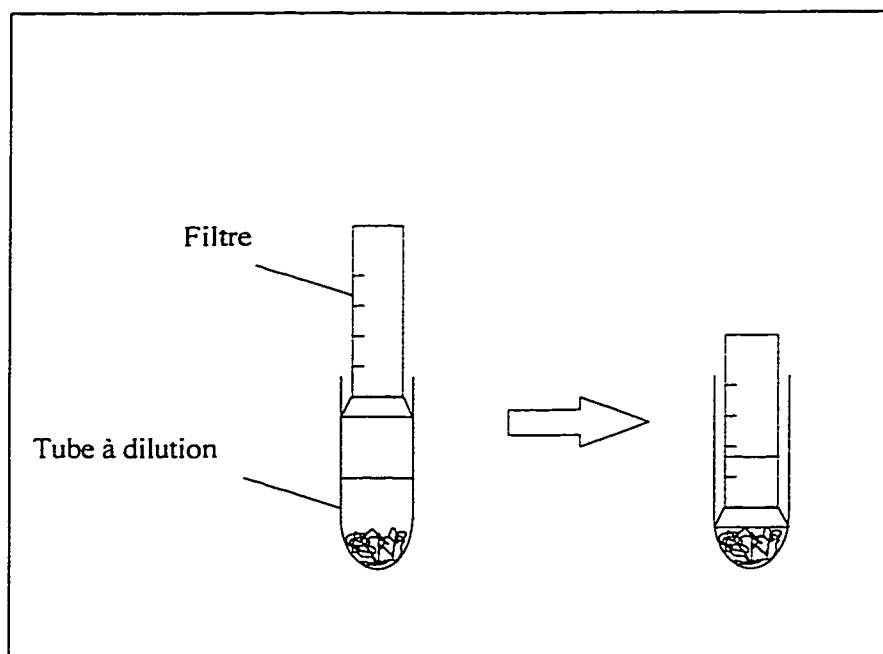
$$\% \text{ de biomasse individuelle} = \% \text{ de biomasse totale} \cdot \frac{(\text{nombre de graine poussée})_{\text{sol témoin}}}{(\text{nombre de graine poussée})_{\text{sol testé}}}$$

### 5.1.3.3 Essai Microtox® en phase solide sur la bactérie luminescente *Vibrio fischeri*

Le protocole utilisé pour l'essai Microtox® en phase solide est basé sur la méthode publiée par le Centre St-Laurent (Environnement Canada, 1995). Chaque échantillon de sol à tester (1 g) est mélangé à 10 ml de solution saline (3,5 % NaCl, *Anachemia*) dans un tube de verre de 50 ml à bouchon (Teflon) vissé. La dilution de chaque échantillon est effectuée en série (1:2) dans des tubes en plastiques de 5 ml (*Columns tubes*, *Azur Environnement*, CA) à l'aide d'une pipette à volume fixe de 1000-5000 ml. L'essai

Microtox est réalisé à six concentrations pour chaque échantillon à tester (25 000, 12 500, 6 250, 3125, 1560 et 780 mg de sol/L de solution). Initialement, 1,5 ml de solution saline (3,5 %) est introduite dans chacun de ces tubes. Pour chaque échantillon, les dilutions sont effectuées en duplicat. Les tubes sont ensuite incubés à 15 °C durant une période de 20 minutes. Pendant ce temps, la préparation de la solution bactérienne est effectuée. Un volume de 1 ml de la solution de reconstitution (*Microtox® Reagent, Azur Environnement*) est tout d'abord incubée à 15 °C dans une cuvette de lecture (*Disposable Glass Cuvettes, Azur Environnement*) pour 10 minutes. La solution de reconstitution est alors transférée dans la bouteille de réactif, laquelle a été jusqu'alors maintenue à - 20 °C. L'homogénéisation est réalisée manuellement par rotation de la bouteille et le réactif biologique reconstitué est rapidement remis dans la cuvette de lecture. Une dernière homogénéisation est faite en aspirant et expirant le contenu de la cuvette de 15 à 20 fois à l'aide d'une pipette à volume fixe de 500 µl avant l'incubation de la solution bactérienne (15 minutes) à 15 °C. Suite à l'incubation des tubes à dilution et de la solution bactérienne, 20 µl de cette dernière est insérée dans chaque tube à dilution en utilisant une pipette automatique et l'homogénéisation est réalisée au vortex. Six témoins (sans sol) sont réalisés pour chaque série effectuée. Après 20 minutes en présence de la suspension bactérienne (20 µL), chaque tube est filtré avec le dispositif prévu à cet effet (*Solid Phase Test Filter, Azur Environnement*) (figure 6.4). Le filtrat (500 µl) est ensuite transféré dans des cuvettes pour la lecture photométrique (Toxicity Analyzer Model 2055) qui est réalisée suivant la procédure normale du Microtox®. Les résultats sont rapportés de la façon suivante pour chaque concentration :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{lecture de bioluminescence})_{\text{sol testé}}}{(\text{lecture de bioluminescence moyenne})_6 \text{ témoins}}$$



**Figure 5.7: Dispositif de filtration du Microtox® en phase solide (Renoux, 1995).**

### 5.1.4 Analyses chimiques

Toutes les analyses sont effectuées par un laboratoire externe accrédité (MAXXAM). Les sections suivantes présentent les méthodes utilisées pour la quantification massique des  $C_{10}$ - $C_{50}$  et des 16 HAP prioritaires, qui est effectuée afin d'évaluer l'efficacité du traitement en terme de concentration résiduelle des contaminants.

#### 5.1.4.1 HAP

L'analyse chimique des 16 HAP prioritaires est basée sur la méthode 8270 (EPA, 1998c) modifiée en mode SIM (*Selective Ion Monitoring*). L'échantillon de sol est homogénéisé et puis séparé en deux fractions, la première servant à la détermination du contenu en eau et la seconde à la quantification massique des HAP. Cette dernière (2 grammes de sol) est asséchée à l'aide de sulfate de sodium pour fin d'analyse. Des standards de récupération (D10-anthracène, D10-pyrène, D12-benzo(a)pyrène) sont alors ajoutés au sol. L'extraction des HAP contenus dans le sol est réalisée à l'aide d'une solution

acétone:dichlorométhane (20:80) en utilisant une sonde à ultra-son selon la méthode 3550 (EPA, 1998a). La purification de l'échantillon est réalisée par chromatographie en perméation de gel selon la méthode 3640 (EPA, 1998b). L'analyse de l'extrait est ensuite effectuée par GC-MS en mode SIM.

#### **5.1.4.2 C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>**

L'analyse chimique des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> est basée sur la méthode MEF n° 410-HYD 1.0. L'échantillon de sol est homogénéisé, puis séparé en deux fractions, la première servant à la détermination du contenu en eau et la seconde pour la quantification massique. Cette dernière (5 grammes de sol sec) est asséchée à l'aide de sulfate de magnésium anhydre, puis les hydrocarbures sont extraits avec de l'hexane (20 ml) à l'aide d'un bain à ultrason. L'extrait est ensuite purifié par l'ajout de gel de silice, lequel permet l'adsorption des substances polaires, et le surnageant est analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID).

#### **5.1.4.3 Échantillons fortifiés**

Un échantillon fortifié a été ajouté à chaque série envoyée au laboratoire externe pour l'analyse des HAP. L'analyse de cet échantillon fortifié permet d'effectuer un contrôle de la méthode analytique du laboratoire.

La matrice de sol utilisée est un mélange du sol provenant de tous les réacteurs au temps initial. Les étapes suivantes ont été réalisées afin d'obtenir une matrice homogène :

- première homogénéisation de l'échantillon composite;
- séchage sous une hotte chimique pendant 24 heures;
- tamisage (< 2 mm);
- seconde homogénéisation;

- entreposage à -20° C des échantillons (2 g).

La solution de fortification a été réalisée par l'ajout des HAP (Kit 610-N, *Supelco*) dans une solution de benzène:dichlorométhane (50:50 v/v) (benzène : qualité = 99,9 %, *Fisher Scientific*; dichlorométhane : qualité = 99,9 %, *Anachemia*). Les HAP ajoutés et leur concentration dans la solution de fortification sont présentés dans le tableau 5.1. La fortification a été effectuée par l'ajout de 100 µl de la solution de fortification au 2 g de sol préparé. En exprimant la concentration du composé i dans l'échantillon avant sa fortification par  $C_{NF}[i]$ , après sa fortification par  $C_F[i]$  et la quantité connue de i ajoutée à l'échantillon par  $Q_F[i]$  en mg/kg de sol sec, la récupération des HAP ajoutés est évaluée de la façon suivante :

$$R[i] = \frac{C_F[i] - C_{NF}[i]}{Q_F[i]}$$

**Tableau 5.1: Composition en HAP de la solution de fortification**

<b>HAP ajoutés</b>	<b>Concentration des HAP dans la solution de fortification (mg/10 ml)</b>
<b>3 anneaux</b>	
Acénaphthylène	16,6
Acénaphthène	4,3
fluorène	5,5
Phénanthrène	5,0
Anthracène	5,7
<b>4 anneaux</b>	
Fluoranthène	10,6
Pyrène	38,5
Benzo[a]anthracène	6,2
Chrysène	11,9
<b>5 anneaux</b>	
Benzo[b+j+k]fluoranthène	5,8
Benzo[a]pyrène	11,2
Dibenzo[ah]anthracène	4,8
<b>6 anneaux</b>	
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	2,0
benzo[ghi]pérylène	5,1

### **5.1.5 Suivi de la minéralisation de phénanthrène radioactif du témoin abiotique**

À l'aide du témoin abiotique, la dégradation abiotique des HAP peut être dissociée de la dégradation biotique. Afin de s'assurer que ce témoin demeure abiotique durant toute la durée de l'expérience, des essais de minéralisation avec du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène (13.3 mCi/mmol) sont effectués. Ainsi à toutes les 3-4 semaines, un échantillonnage du témoin abiotique est réalisé (la méthode d'échantillonnage est présentée à la section 5.1.2.4). L'échantillon composite est homogénéisé, puis réparti dans trois bouteilles sérologiques de 125 ml (triplicat). L'essai de minéralisation est alors effectué selon la méthodologie décrite au chapitre 4 (4.1.2.4.1).



### 5.1.6 Comparaison temporelle de la minéralisation de phénanthrène des différents traitements

L'activité de biodégradation du sol peut varier au cours du traitement. L'activité initiale du sol contaminé avant son traitement a été évaluée à l'aide du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène (13,3 mCi/mmol), du  $^{14}\text{C}$ -anthracène (15,0 mCi/mmol), du  $^{14}\text{C}$ -pyrène (32,3 mCi/mmol). Afin d'évaluer la variation temporelle de la biodégradation des essais de minéralisation ont par la suite été effectués avec du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène. Suite à l'échantillonnage des réacteurs et à l'homogénéisation de l'échantillon composite (section 5.1.2.4), l'échantillon est réparti dans des bouteilles sérologiques (triplicat). Un témoin abiotique est ajouté à chaque échantillon. L'essai de minéralisation est effectué selon la méthodologie décrite au chapitre 4 (4.2.1.3).

### 5.1.7 Étude de la décoloration du Poly R sur gélose

Toutes les opérations ont été effectuées sous la hotte biologique (*BioKlone2*, *Microzone Corporation*) afin de prévenir la contamination des échantillons. Des échantillons de sols prélevés à la 12<sup>e</sup> semaine (10 g) ont été suspendus dans 90 ml de solution saline 8,5 % (*Anachemia*); cette première opération correspond à la dilution  $10^{-1}$ . Après 40 min de mélange, les dilutions  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  ont été réalisées. La composition des milieux utilisés est présentée à l'annexe B. Des aliquots de 100  $\mu\text{l}$  ont été transférés, à l'aide d'une pipette à volume fixe de 100  $\mu\text{l}$  avec des embouts stérilisés (121 °C, 1,1 kg/cm<sup>2</sup> pour 30 min.), sur des géloses de milieu streptomycine. Après une incubation de 5 jours à 20° C, les colonies présentes ont été repiquées à l'aide d'une boucle d'inoculation sur des géloses de Poly R streptomycine. *P. chrysosporium* a la capacité de dégrader le colorant rouge Poly R; une décoloration (passage du rouge au jaune) notée après 1 semaine sur les géloses est donc imputée à l'action des enzymes de ce champignon.

## 5.2 Résultats et discussion

### 5.2.1 Caractéristiques initiales du sol contaminé

Le sol contaminé à l'étude doit posséder certaines caractéristiques initiales pour qu'il puisse être utilisé comme matrice pour l'expérimentation. Premièrement, le but de l'expérience étant de réaliser une évaluation écotoxicologique, il est primordial d'obtenir une réponse toxique associée au sol contaminé avant son traitement. L'analyse chimique des contaminants est parfois insuffisante pour déduire de la toxicité de la contamination. En effet, il arrive parfois qu'une concentration élevée en contaminant ne produise aucun effet toxique. Cette situation est survenue lors de l'analyse initiale d'un échantillon de sol contaminé par 2000 mg/kg d'huiles et graisse dans l'étude réalisée par Renoux *et al.* (1995). Des essais de toxicité ont donc été réalisés sur le sol avant son traitement. Deuxièmement, pour effectuer la restauration du sol à l'étude par voie biologique, il faut s'assurer de la présence de micro-organismes dégradant les HAP. Cette propriété a été vérifiée via un essai de minéralisation avec le phénanthrène, l'anthracène et le pyrène comme contaminants cibles. Troisièmement, la concentration des HAP dans le sol doit être suffisante pour permettre le suivi chimique. À cette fin l'analyse chimique des 16 HAP prioritaires a été effectuée sur le sol avant son traitement.

Les sections suivantes présentent les résultats obtenus de cette caractérisation initiale.

#### 5.2.1.1 Réponse toxique initiale

La réponse toxique initiale associée au sol contaminé a été déterminée à l'aide des essais de mortalité du ver *Eisenia foetida* et de germination et de croissance du cresson *Lepidium sativum*.

Les résultats des essais, présentés au tableau 5.2 représentent la moyenne de 2 échantillons composites et sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin.

**Tableau 5.2 : Toxicité du sol contaminé avant son traitement (n=2)**

<b>Essai de toxicité</b> paramètre de mesure	<b>Réponse toxique</b> (moyenne $\pm$ écart-type)
<b>mortalité du ver</b>	
mortalité sur 14 jours (%)	100 $\pm$ 0
<b>germination du cresson</b>	
germination sur 4 jours (%)	35 $\pm$ 46
<b>croissance du cresson</b>	
émergence sur 16 jours (%)	38 $\pm$ 42
biomasse totale sur 16 jours (%)	26 $\pm$ 26
biomasse individuelle sur 16 jours (%)	46 $\pm$ 27

Le contact avec le sol contaminé a généré la mortalité de tous les vers exposés durant l'essai (30 vers). Les résultats obtenus ne sont pas le fait d'une mort en cascade des vers. des interférences causés par la densité de population ou par le type de sol utilisé. En effet, pour prévenir ces phénomènes les vers ont été pairés (2 vers \* 15 réplicats) (Gibbs *et al.*, 1996). La mortalité élevée obtenue est donc directement associée au sol contaminé. Cependant, la toxicité inhérente du sol et celle associée à la contamination ne peuvent être dissociées par l'utilisation de l'outil écotoxicologique.

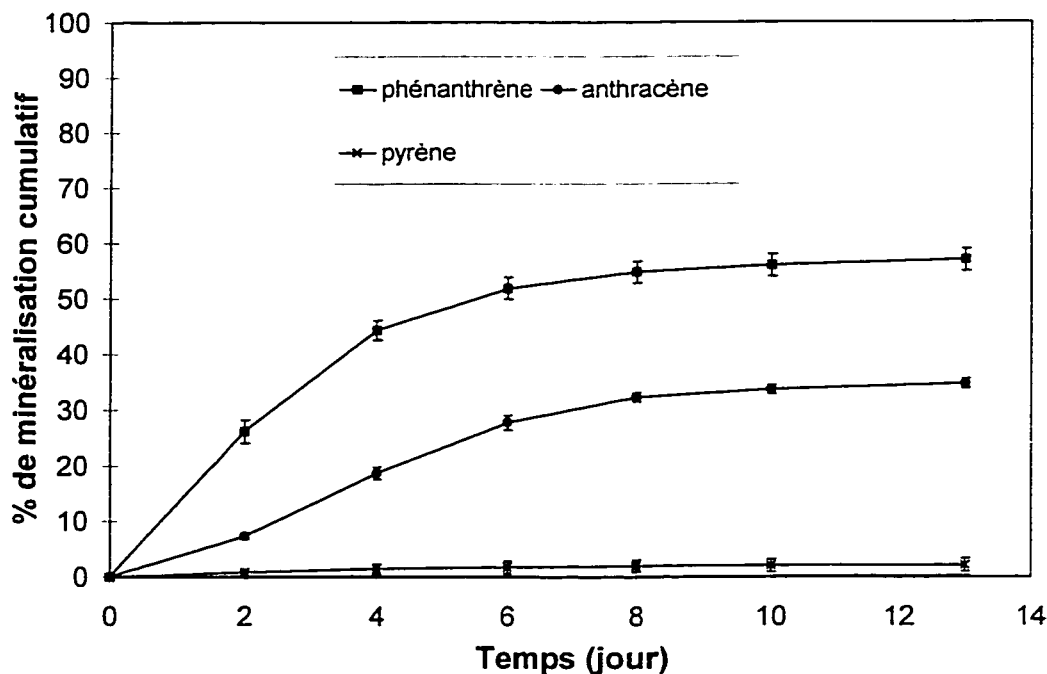
Les paramètres de mesure des essais de germination et de croissance du cresson sont exprimés par rapport aux mesures effectuées sur le sol témoin. En ce sens, plus le pourcentage de germination ou de croissance se rapproche de 100 %, plus la réponse toxique associée à la contamination est faible. La germination notée après 4 jours est de 35 %, l'émergence des plantules de cresson après 16 jours est de 38 %, la biomasse totale et individuelle sont respectivement 26 et 46 %. L'écart-type calculé à partir des 2

réplicats est très élevée pour les essais de toxicité effectués sur le cresson. Toutefois, les valeurs obtenues confirment la toxicité initiale du sol contaminé avant son traitement.

Il serait vain de comparer les résultats obtenus avec ceux de la littérature puisque la toxicité est inhérente aux caractéristiques pédologique du sol et aux contaminants qui s'y retrouvent. Cependant, la réponse toxique associée aux sols contaminés aux HAP n'est pas inhabituelle. En effet, plusieurs HAP sont considérés cancérigènes (Cheremisinoff, 1995). Une étude effectuée par Hund et Traunspurger (1994) rapporte une mortalité de 100 % du ver *Eisenia foetida* suite à son contact avec un sol contaminé aux HAP avant son traitement. Les essais de toxicité effectués sur le ver et le cresson montrent qu'il y a une toxicité associée au sol contaminé avant son biotraitement.

#### **5.2.1.2 Présence de micro-organismes dégradant les HAP**

Avant de procéder à l'évaluation écotoxicologique et chimique d'un traitement biologique d'un sol contaminé aux HAP, une vérification de l'activité de biodégradation des micro-organismes indigènes du sol a été effectuée. Cette vérification est réalisée par l'ajout de composés radiomarqués et par le suivi de la production de  $^{14}\text{CO}_2$  (section 5.1.6). Les résultats présentés à la figure 5.8 montrent les courbes de minéralisation obtenues pour le phénanthrène et l'anthracène (3 anneaux) et le pyrène (4 anneaux). Les HAP réellement présents dans le sol sont adsorbés depuis une grande période de temps alors que les composés radiomarqués ajoutés ne le sont pas autant, il est donc impossible d'extrapoler les temps obtenus à celui requis pour la décontamination du sol à l'étude.



**Figure 5.8: Minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène, du  $^{14}\text{C}$ -anthracène et du  $^{14}\text{C}$ -pyrène dans le sol contaminé.** (Les résultats représentent la moyenne de trois réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

Les résultats montrent que les micro-organismes indigènes du sol possèdent le potentiel de biodégradation des HAP étudiés. Après 8 jours d'incubation, le phénanthrène, l'anthracène et le pyrène ont été minéralisés à 55 %, 32 % et 2 % respectivement. De plus, on constate que plus le nombre d'anneaux augmente plus le HAP est dégradé lentement, ce qui correspond à ce qui est rapporté dans la littérature (Cookson, 1995). Bien que les micro-organismes présents possèdent un potentiel pour la biodégradation des HAP, on remarque que la dégradation du pyrène est faible. Par conséquent, la bioaugmentation d'un inoculum de *P. chrysosporium* pourrait améliorer la dégradation des HAP de masse molaire élevée contenus dans le sol contaminé.

### 5.2.1.3 Caractérisation chimique du sol de départ

Le tableau 5.3 présente la caractérisation chimique initiale du sol. Les concentrations des HAP ont été obtenues de la moyenne de 22 échantillons composites provenant des différents réacteurs.

L'analyse chimique révèle une concentration élevée en HAP, soit 531 mg/kg. Cette valeur est largement supérieure à celle du critère C qui est de 200 mg/kg. Le sol à l'étude doit donc être restauré en vertu de la *Politique de protection et de réhabilitation des terrains contaminés* (MEF, 1998).

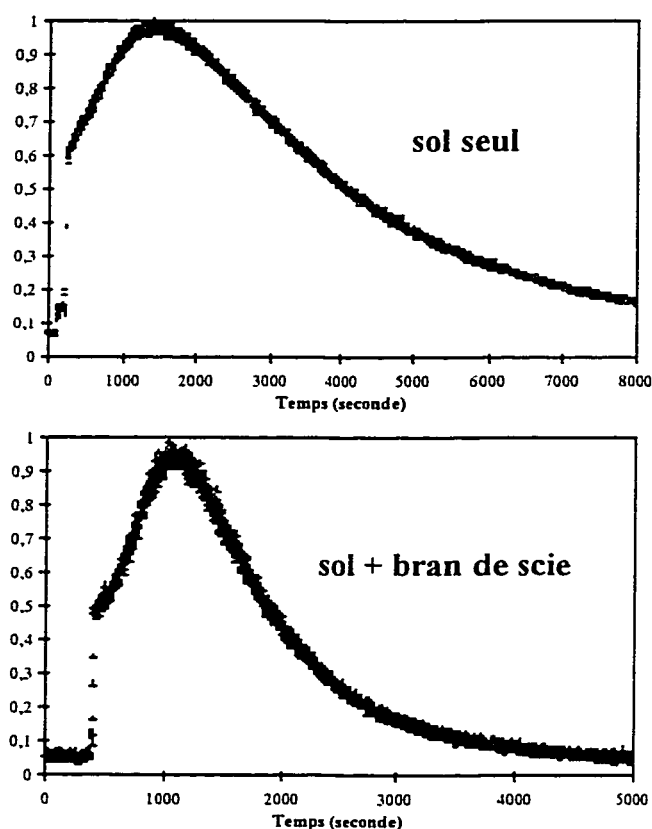
**Tableau 5.3 : Caractérisation chimique du sol provenant de la sablière Thouin de l'Assomption**

Contaminants	Concentration (mg/kg)	Critères de la contamination des sols (MEF, 1988)		
		A	B	C
<b>3 anneaux</b>				
Acénaphthylène	88	< 0,1	10	100
Acénaphène	8	< 0,1	10	100
Phénanthrène	3	< 0,1	5	50
Anthracène	17	< 0,1	10	100
<b>4 anneaux</b>				
Fluoranthène	41	< 0,1	10	100
Pyrène	163	< 0,1	10	100
Benzo[a]anthracène	29	< 0,1	1	10
Chrysène	51	< 0,1	1	10
<b>5 anneaux</b>				
Benzo[b+j+k]fluoranthènes	46	< 0,1	1	10
Benzo[a]pyrène	41	< 0,1	1	10
Dibenzo[ah]anthracène	5	< 0,1	1	10
<b>6 anneaux</b>				
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	12	< 0,1	1	10
benzo[ghi]pérylène	17	< 0,1	1	10
dibenzo[a,i]pyrène	4	< 0,1	1	10
dibenzo[a,h]pyrène	1	< 0,1	1	10
dibenzo[a,l]pyrène	5	< 0,1	1	10
Total HAP	531	1	20	200
C10-C50	33 000			

L'analyse des concentrations de chaque HAP permet à cette étape-ci de sélectionner les contaminants qui serviront à suivre le traitement de biodégradation. La limite de détection de l'analyse chimique est de 1 mg/kg, la concentration des HAP sélectionnés doit donc permettre leur suivi tout le long du traitement sans interférer avec la limite de détection. Afin de s'en assurer la concentration finale limite des HAP étudiée doit être supérieure à 10 mg/kg. Les HAP dont la concentration initiale est supérieure au critère C ou très près, soit l'acénaphthylène, le pyrène, le benzo(a)anthracène, le chrysène, le benzo(b+j+k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène, l'indéno(1,2,3-cd)pyrène et le benzo(ghi)pérylène ont donc été sélectionnés pour effectuer le suivi du traitement.

### **5.2.2 Aération des réacteurs**

Les réacteurs conçus doivent répondre à un objectif principal, soit l'uniformité de l'aération. Les résultats de l'essai de traceur présentés à la figure suivante permettent de caractériser l'aération.



**Figure 5.9: Distribution de l'argon radioactif à la sortie des réacteurs.**

Les résultats ont été normalisés de façon à obtenir une échelle de lecture entre 0 et 1. La distribution du temps de séjour peut être quantifiée par plusieurs paramètres tels le temps de séjour moyen et le nombre de Peclet. Dans le cadre de la présente étude, la seule information nécessaire, étant donné la mise à l'échelle réduite d'une biopile pour la conception des réacteurs, est la présence ou non de chemins préférentiels. Dans le cas où des chemins préférentiels seraient présents, la distribution serait inégale et comporterait plusieurs pics de plus faible intensité. Étant donné cette évaluation qualitative possible, il a été jugé vain d'évaluer les paramètres quantitatifs de la distribution du temps de séjour. Les résultats présentés montrent une aération uniforme exempte de chemins préférentiels. Par conséquent, la configuration utilisée pour la conception des réacteurs est adéquate pour atteindre les objectifs du projet.



### 5.2.3 Homogénéité du sol de départ

Afin d'évaluer la détoxification du sol et l'efficacité du traitement en terme de concentration globale des contaminants, il faut s'assurer de l'homogénéité du sol entre les différents réacteurs. Cette homogénéité est indispensable pour la comparaison des différents traitements. À cet effet, la caractérisation initiale des 22 échantillons composites provenant des réacteurs à lit fixe permet de vérifier cette homogénéité par l'étude des écarts-type (é.t.). Le tableau 5.4 présente les coefficients de variation obtenus pour les HAP qui sont suivis.

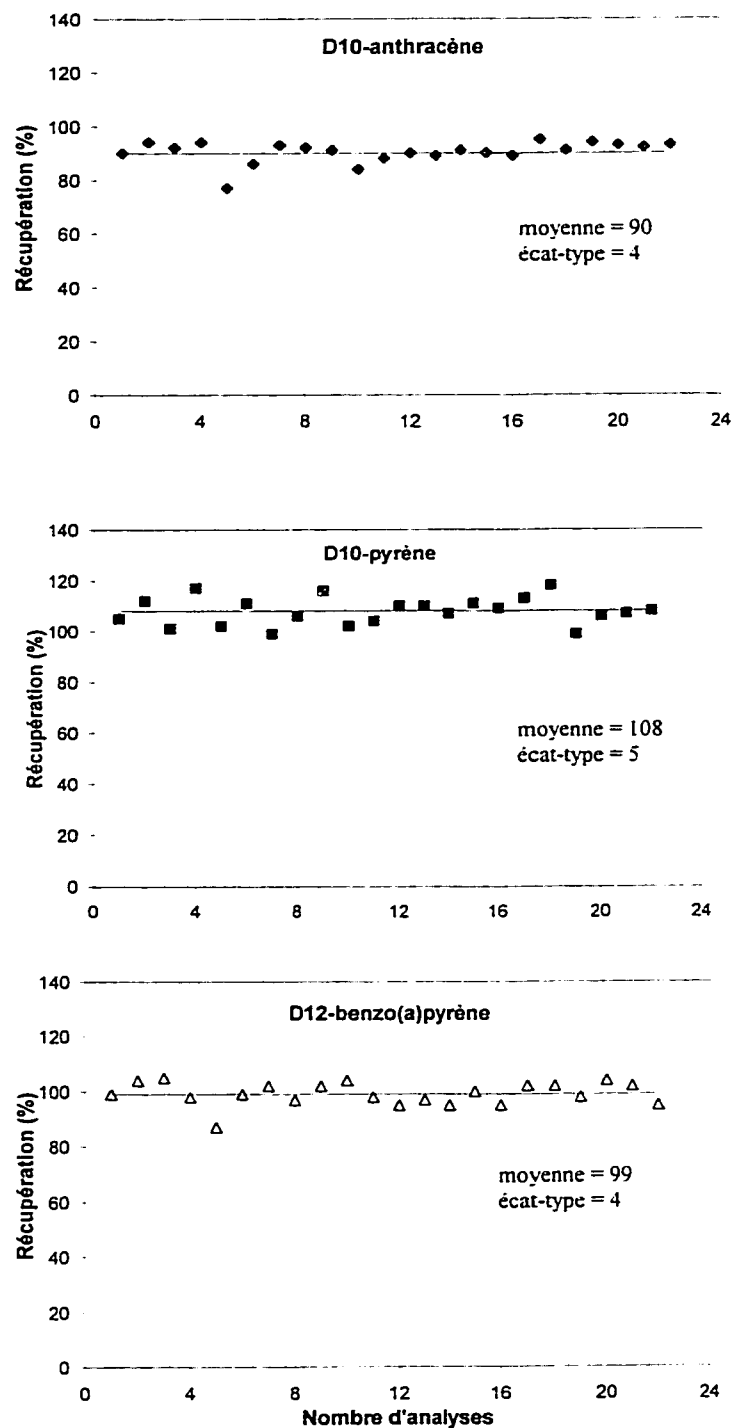
**Tableau 5.4: Coefficients de variation obtenus pour les HAP suivis suite à l'analyse en duplicat des 11 réacteurs (jour 0)**

Contaminants	Coefficient de variation (%)
<b>3 anneaux</b>	
Acénaphthylène	11
<b>4 anneaux</b>	
Fluoranthène	11
Pyrène	14
Benzo[a]anthracène	11
Chrysène	8
<b>5 anneaux</b>	
Benzo[b+j+k]fluoranthènes	7
Benzo[a]pyrène	10
<b>6 anneaux</b>	
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	11
benzo[ghi]pérylène	8

Les coefficients de variation obtenus de l'analyse des 22 échantillons varient de 7 à 14 %. La valeur la plus faible a été obtenue pour le benzo[b+j+k]fluoranthène et la plus élevée pour le pyrène. Ces valeurs sont très acceptables si on considère qu'elles sont attribuables d'une part à l'hétérogénéité du sol entre les 22 échantillons composites et à la reproductibilité de la méthode d'analyse. Le sol utilisé au départ pour l'évaluation du potentiel de biodégradation des HAP selon les différents traitements effectués peut donc

être considéré comme étant homogène entre les différents réacteurs au début du traitement (jour 0).

Lors de l'analyse effectuée par le laboratoire, des standards de récupération ont été ajoutés au sol. L'ajout dosé a été effectué pour 3 HAP soit le D10-anthracène, le D10-pyrène et le D12-benzo(a)pyrène. Le pourcentage de récupération de ces standards permet d'effectuer un contrôle de la qualité des analyses chimiques. L'analyse initiale de 22 échantillons a permis d'établir une moyenne de récupération et une déviation standard adaptées au sol utilisé (voir figure 5.10). Le pourcentage de récupération des trois standards ajoutés est considéré acceptable puisque l'écart-type entre les 22 échantillons est inférieure ou égale à 5. La récupération moyenne du D10-anthracène a été de  $90 \pm 4$ , celle du D10-pyrène de  $108 \pm 5$  et celle du D12-benzo(a)pyrène de  $99 \pm 4$ . Il a ainsi été établi que la récupération des ajouts dosés devait s'échelonner entre la moyenne et  $\pm 2$  é.t..



**Figure 5.10: Récupération des standards ajoutés aux 22 échantillons composites par le laboratoire externe (MAXXAM) lors de l'analyse initiale des sols (D10-anthracène, D10-pyrène, D12-benzo(a)pyrène).**

## 5.2.4 Évolution de la toxicité globale du sol contaminé à l'étude lors de son traitement

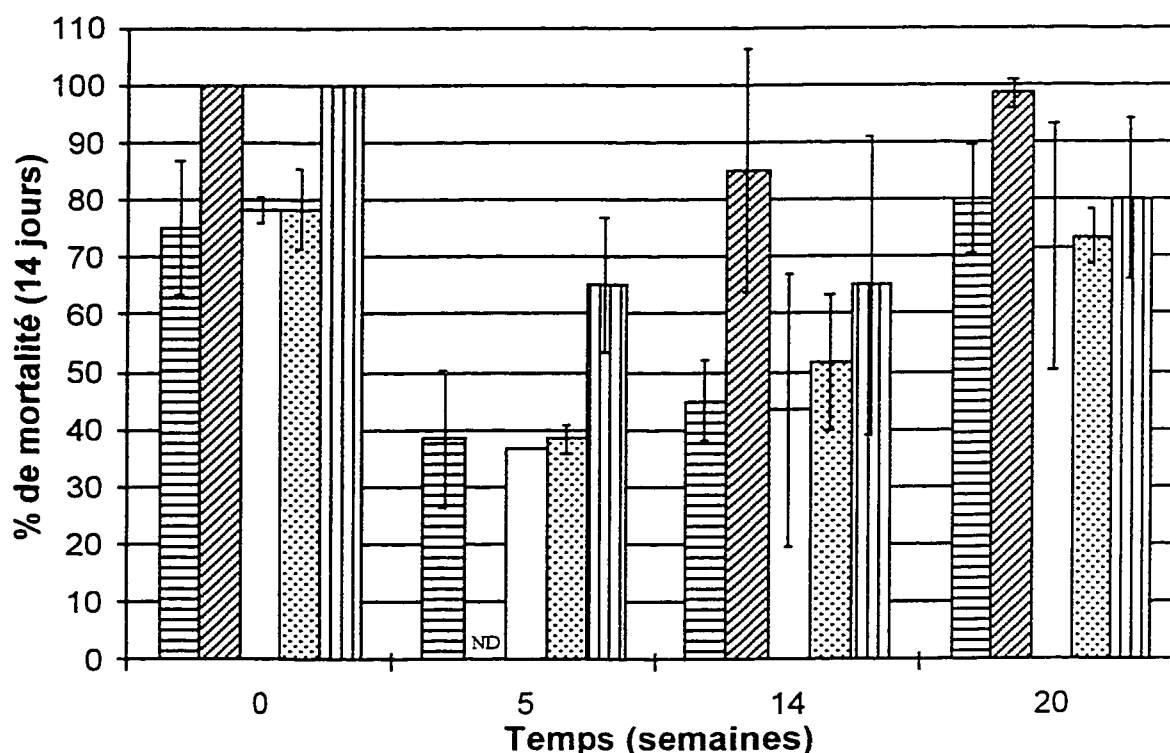
Afin d'étudier l'évolution de la toxicité apportée par les différents traitements appliqués au sol, des essais de toxicité sur le ver *Eisenia foetida*, sur le cresson *Lepidium sativum*, et sur la bactérie luminescente *Vibrio fischeri* ont été effectués. Les résultats de ces essais sont présentés dans les sections suivantes.

### 5.2.4.1 Essai de toxicité sur le ver *Eisenia foetida*

La figure 5.11 présente les résultats obtenus lors de l'essai de toxicité sur le ver *Eisenia foetida*. Ces résultats montrent que la toxicité de la matrice, exprimée en terme de pourcentage de mortalité du ver, évolue dans le temps et selon les différents traitements appliqués. L'évolution de la toxicité des traitements 1, 3 et 4 est semblable. En effet, dans ces traitements le pourcentage de mortalité est en moyenne de 76 % au temps initial, de 38 % à la 4<sup>e</sup> semaine, de 46 % à la 14<sup>e</sup> semaine et de 75 % à la 20<sup>e</sup> semaine. Ainsi, après 5 semaines de traitement, on note une réduction d'environ 50 % de la toxicité dans ces traitements par rapport à la toxicité initiale. Malgré cette diminution transitoire de toxicité, on note une augmentation à la 14<sup>e</sup> semaine qui est confirmée par les valeurs obtenues à la 20<sup>e</sup> semaine.

Pour ce qui est du traitement 2, le pourcentage de mortalité demeure très élevé tout au long du traitement soit de près de 100 %. Étant donné que la seule différence entre le traitement 1 et 2 consiste en l'irradiation du sol du traitement 2 au temps initial, il semble que l'irradiation du sol a une influence sur la toxicité globale décelée. En effet, pour tous les points d'échantillonnage, on note une différence d'au moins 10 % du taux de mortalité entre les deux traitements, et ce en tenant compte des incertitudes. L'irradiation du sol a pour conséquence d'éliminer les micro-organismes indigènes du sol. Par conséquent,

l'action de ces derniers semble avoir une plus grande influence que celle apportée par le champignon.



**Figure 5.11:Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de pourcentage de mortalité du ver *Eisenia foetida* après 14 jours d'incubation.** ▨ Traitement 1 : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), ▩ Traitement 2 : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), □ Traitement 3 : sol biostimulé (bran de scie et MSM), ▤ Traitement 4 : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et ▮ Traitement 5 : sol sans traitement. ND : Non-disponible. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

Dans le traitement 5, il semble que le pourcentage de mortalité diminue de 100 % à environ 80 % après 20 semaines. Après la diminution initiale mesurée à la 5<sup>e</sup> et 14<sup>e</sup> semaine (65 %), on note une augmentation à la 20<sup>e</sup> semaine (80 %). Cependant en tenant compte de l'écart entre les duplicats, on ne peut qu'affirmer qu'après une première diminution à la 5<sup>e</sup> semaine, la toxicité demeure constante par la suite.

L'analyse des résultats au temps initial démontre que l'application d'un traitement biologique contrôlé, par la biostimulation des micro-organismes indigènes ou par la bioaugmentation d'un champignon, entraîne une réduction de la toxicité initiale du sol contaminé aux HAP. De plus, la comparaison des traitements 1 et 3 au temps initial indique que la présence du champignon ne modifie pas la réponse toxique mesurée. Ce résultat est important puisqu'il démontre que le champignon en lui-même n'est pas une source de toxicité.

L'augmentation de la toxicité après 14 et 20 semaines est reliée au traitement puisque cette augmentation ne se produit pas dans le sol n'ayant pas reçu de traitement (traitement 5). Une telle augmentation de la toxicité a déjà été obtenue par Renoux *et al.* (1995) dans un sol contaminé aux hydrocarbures durant son traitement en biopile. Des différents facteurs étudiés, soit l'ajout de MSM, de bran de scie et de l'inoculum de *P. chrysosporium*, seul le MSM semble avoir une influence sur la diminution de la toxicité. En effet, le MSM est présent dans les traitements 1, 2, 3 et 4 et aucune différence de toxicité n'a été mesurée entre ces traitements par rapport au sol sans traitement. L'apparition de métabolites toxiques ou une augmentation de la biodisponibilité (assimilation plus rapide des contaminants par le ver) pourraient expliquer l'augmentation de toxicité du sol notée au cours des traitements.

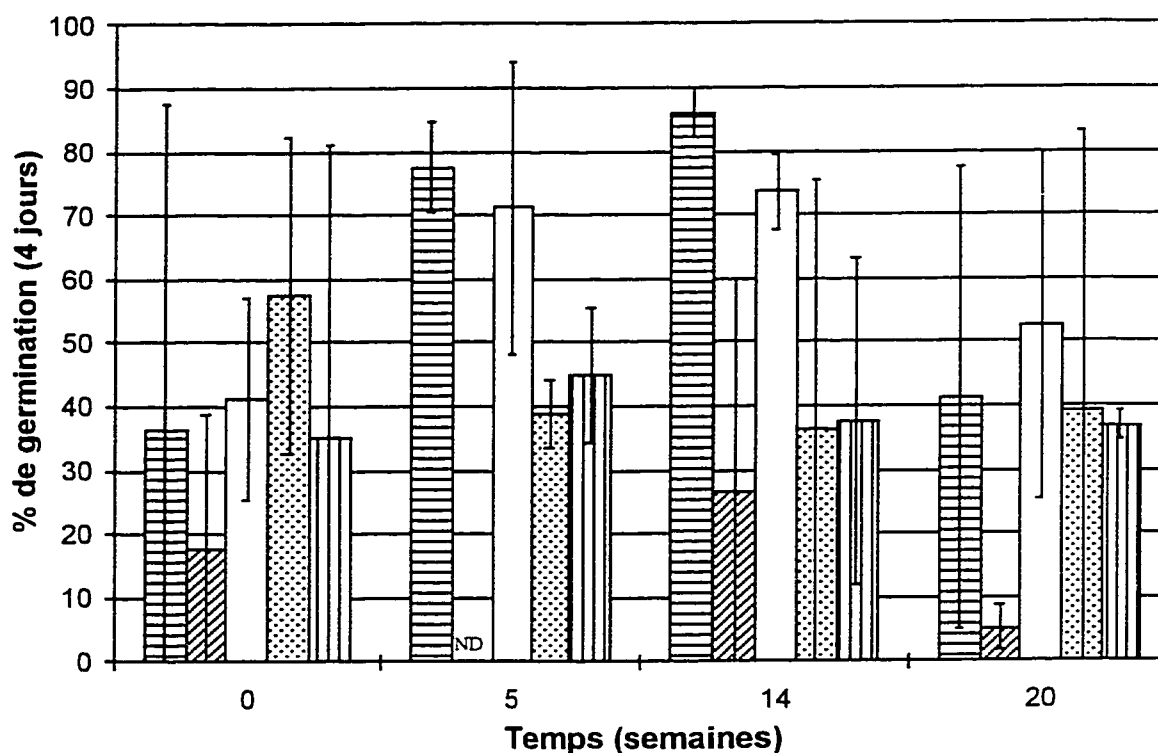
*P. chrysosporium* utilise un système enzymatique extra-cellulaire non-spécifique permettant la dégradation des contaminants organiques (section 2.5). La possibilité d'apparition de métabolites toxiques a déjà été soulevée dans plusieurs études (Hammel *et al.*, 1986; Morgan *et al.*, 1991). Bien que la toxicité ait augmentée au cours du traitement utilisant ce champignon, elle a aussi augmentée dans les autres traitements. Puisque la toxicité initiale du sol est la même dans les traitements utilisant le champignon et les micro-organismes indigènes du sol, on peut supposer que l'utilisation spécifique de *P. chrysosporium* ne conduit pas à une augmentation supplémentaire de la toxicité du sol.

La baisse intermédiaire notée par l'essai sur le ver indique une modification globale de la toxicité du sol. Puisque cette réduction n'est qu'intermédiaire, il apparaît que les 20 semaines de traitement sont insuffisantes pour détoxifier le sol à l'étude. Dans une étude réalisée par Hund et Traunspurger (1994) sur un sol contaminé aux HAP, une mortalité plus élevée avait été obtenue après 4 mois de traitement (100 %) et tous les vers survivaient après 7 mois de traitement.

#### **5.2.4.2 Essai de toxicité sur le cresson *Lepidium sativum***

La figure 5.12 présente les résultats de toxicité obtenus de l'essai sur la germination du cresson *Lepidium sativum*. La germination, évaluée sur 4 jours, représente le nombre de graines ayant germé et est exprimé par rapport à celui du témoin.

Pour les traitements 1 et 3 on note une augmentation intermédiaire du pourcentage de germination, suivie par une diminution après 20 semaines de traitement. Cependant, en considérant les incertitudes, on ne peut affirmer que la toxicité a effectivement variée dans ces traitements. Dans les autres traitements (2, 4 et 5), la toxicité semble demeurer constante sur une période de 20 semaines en considérant l'écart entre les duplicats.



**Figure 5.12: Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de pourcentage de germination du cresson *Lepidium sativum*. après 4 jours d'incubation.** **Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM), **Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et **Traitement 5** : sol sans traitement. ND : Non-disponible. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

Le pourcentage de germination au temps initial est semblable pour tous les traitements, les valeurs obtenues montrent qu'une réponse toxique est associée au sol contaminé. Après 5 semaines de traitement, la toxicité est beaucoup moins élevée dans le traitement avec champignon (1) que dans le traitement avec nutriment (4) et le sol sans traitement (5). Pour ce même temps d'échantillonnage, le pourcentage de germination est plus élevé dans le traitement 3 que dans le traitement 4. Étant donné que la seule différence entre ces deux traitements est la présence de bran de scie dans le traitement 3, il semble que la



diminution de la compaction apporté par cet élément a une influence sur la toxicité globale décelée. Après 14 semaines de traitement, le pourcentage de germination est plus élevé dans le traitement avec champignon (1) que dans tous les autres traitements. Cependant après 20 semaines, la toxicité redevient semblable pour tous les traitements. Il est intéressant de constater que la toxicité est plus élevée dans le traitement dont le sol a été préalablement irradié (2) que dans le traitement 1. Étant donné que la seule différence entre ces traitements est l'irradiation du sol au temps initial, il semble que l'irradiation du sol a une influence sur la toxicité mesurée, comme les résultats de toxicité avec le ver *Eisenia foetida* l'ont montré.

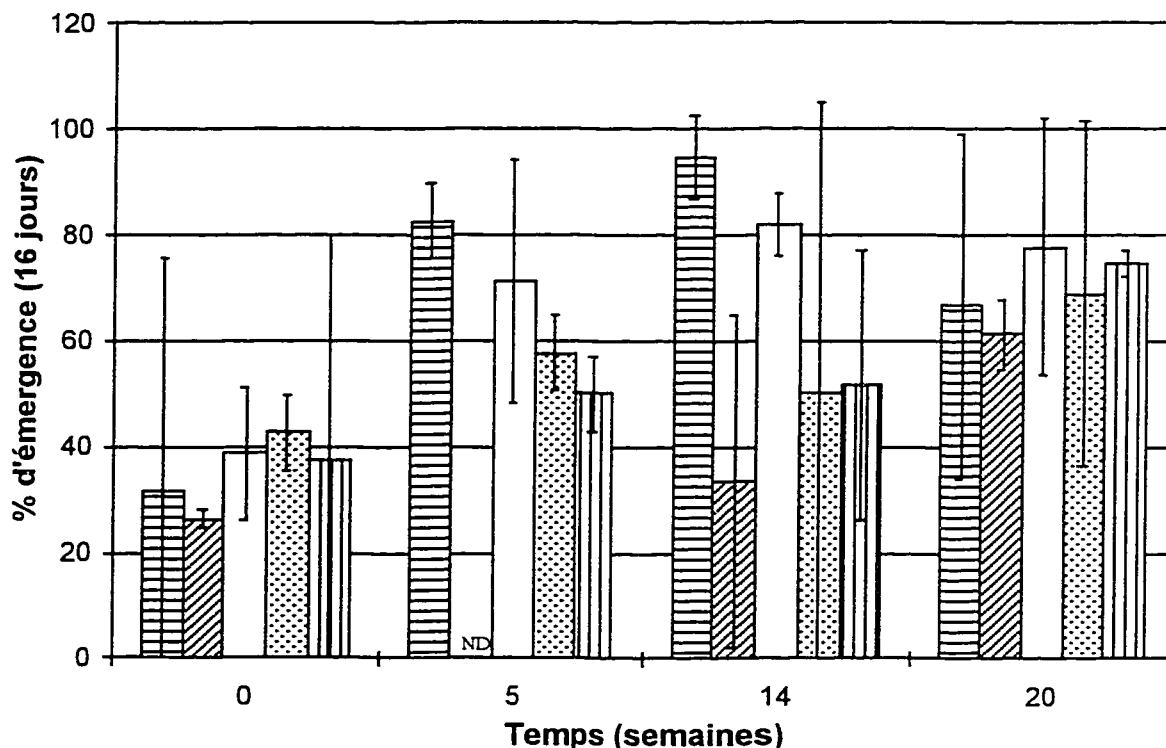
Le traitement par bioaugmentation de *P. chrysosporium* ne semble pas conduire pas à une augmentation de la toxicité du sol contaminé, telle que mesurée dans l'essai de toxicité sur la germination du cresson. La crainte de plusieurs auteurs sur la formation possible de métabolites toxiques ne semble donc pas se confirmer lorsque la toxicité est mesurée par la germination du cresson tout comme dans l'essai sur le ver (Hammel *et al.*, 1986; Morgan *et al.*, 1991). Cependant, étant donné la grande variabilité obtenue de l'essai de germination, il est impossible d'affirmer quel amendement (*P. chrysosporium*, bran de scie ou nutriments) a la plus grande influence sur l'évolution de la toxicité.

Toutefois, dans tous les traitements, on remarque que la germination est inférieure à celle du témoin (sol artificiel non contaminé), puisque le pourcentage de germination est inférieur à 100 % tout le long du traitement. Sur une période de 4 jours, la plante peut utiliser les ressources internes de la graine et ainsi ne pas être affectée par la présence de la contamination. Néanmoins, puisque la germination est inférieure à celle du témoin, tout semble indiquer que la contamination du sol limite la germination dans les échantillons analysés. Toutefois, la comparaison des résultats de toxicité obtenus du sol contaminé et du sol témoin doit être réalisée avec soin puisque la germination des plantes peut être affectée par les propriétés physico-chimique des sols (Sheppard *et al.*, 1993).

Les résultats de germination du cresson montrent aussi que l'inhibition de la germination est semblable entre le temps initial et la 20<sup>e</sup> semaine. Ainsi, les 20 semaines de traitement semblent insuffisant pour détoxifier le sol contaminé.

Les figures 5.13, 5.14 et 5.15 présentent les résultats obtenus sur la croissance du cresson *Lepidium sativum* en terme de pourcentage d'émergence, de biomasse totale et individuelle. Le pourcentage d'émergence représente le nombre de plantes qui ont effectivement poussées après 16 jours par rapport à celui du témoin. La toxicité est représentée par l'inverse de l'émergence des pousses.

L'évolution de la toxicité, exprimée en terme de pourcentage d'émergence des pousses, est semblable dans les traitement 1 et 3. Le pourcentage d'émergence augmente à la 5<sup>e</sup> et 14<sup>e</sup> semaine puis diminue après les 20 semaines de traitement. Toutefois, en considérant les incertitudes, on ne peut qu'affirmer que l'émergence des pousses a augmentée entre le temps initial et la 14<sup>e</sup> semaine pour les traitements 1 et 3. En considérant les incertitudes, le pourcentage d'émergence mesuré demeure constant tout le long du traitement 4. Pour ce qui est du traitement 5, on constate que la toxicité y demeure constante entre le temps initial et la 20<sup>e</sup> semaine. Cependant, il semble que la toxicité soit plus élevée à la 5<sup>e</sup> qu'à la 20<sup>e</sup> semaine. Le pourcentage d'émergence des pousses dans le traitement 2 semble rester constant entre le temps initial et la semaine 14 et augmenter légèrement à la fin du traitement.



**Figure 5.13:Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de pourcentage d'émergence du cresson *Lepidium sativum*.après 16 jours d'incubation.** **Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM), **Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et **Traitement 5** : sol sans traitement. **ND** : Non-disponible. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

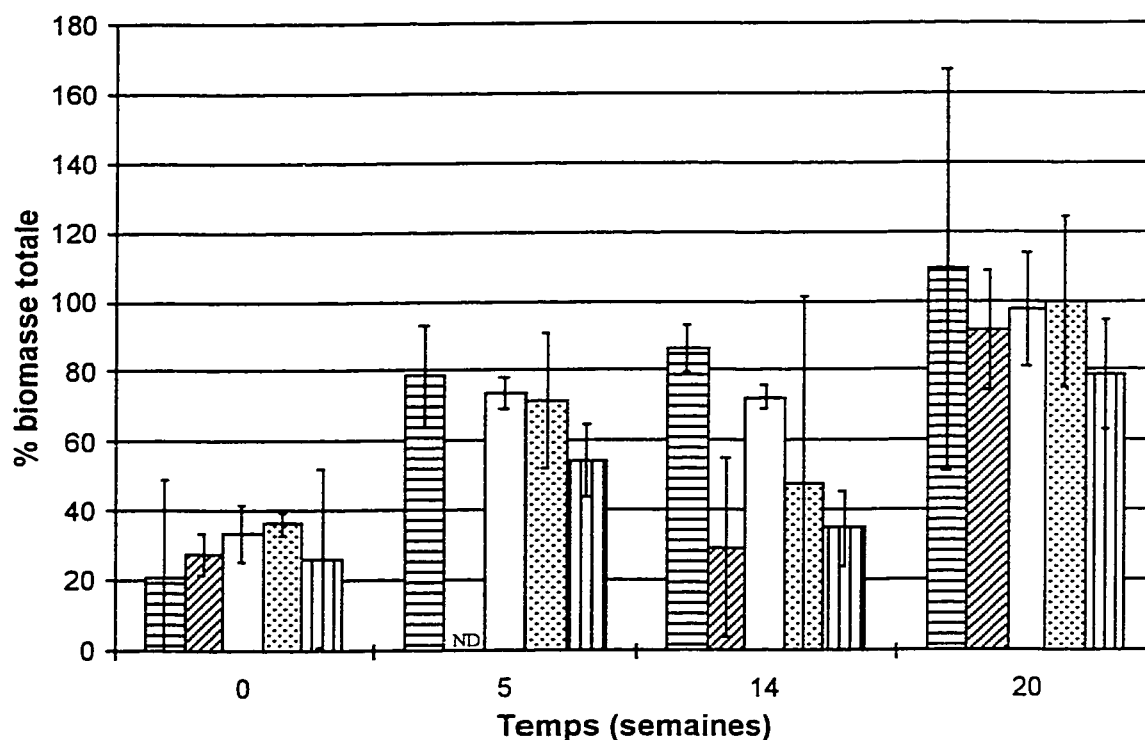
En considérant les incertitudes, la toxicité semble être égale pour tous les traitements au temps initial, avec une légère différence entre les traitements 2 et 4. Après 5 semaines, le pourcentage d'émergence est plus élevé dans le traitement 1 que dans les traitement 4 et 5. Au même point d'échantillonnage, la toxicité est semblable pour les traitements 3, 4 et 5. Après 14 semaines, l'émergence des pousses est plus élevée dans le traitement 1 que dans les traitements 2 et 5, mais égale à celle notée dans les traitements 3 et 4. À la fin du traitement, la toxicité redevient égale pour tous les traitements.

La biostimulation par l'ajout de bran de scie et de nutriments (traitement 3) et la bioaugmentation par l'ajout d'un inoculum de *P. chrysosporium* sur un support de bran de scie et de nutriments (traitement 1) apportent une diminution transitoire de la toxicité. Cependant, la présence de *P. chrysosporium*, sans être néfaste, ne diminue pas la toxicité par rapport au traitement sans champignon.

L'émergence des pousses est inférieure à celle du témoin, puisqu'elle est inférieure à 100 % tout le long du traitement. Ainsi, il semble que des facteurs externes reliés à la contamination du sol limitent l'émergence des pousses dans les échantillons analysés. L'émergence des pousses après 16 jours d'incubation est supérieure à la germination obtenue après 4 jours d'incubation à la 20<sup>e</sup> semaine du traitement.

La biomasse totale est présentée à la figure 5.14. Elle représente le poids total des tiges de plantes poussées par rapport à celui du témoin. La toxicité est représentée par l'inverse de la biomasse totale produite.

La toxicité évolue de la même manière dans les traitement 1, 3 et 4. Ainsi, après 5 semaines, on note une augmentation de plus de 50 % de la biomasse totale dans ces traitements par rapport à celle mesurée au temps initial. En effet, entre ces deux points d'échantillonnage, le pourcentage de biomasse totale passe de 20 % à 78 % pour le traitement 1, de 34 % à 73 % pour le traitement 3 et de 36 % à 71 % pour le traitement 4. La toxicité demeure par la suite constante entre la 5<sup>e</sup>, la 14<sup>e</sup> et la 20<sup>e</sup> semaine pour ces trois traitements. Le pourcentage de biomasse totale demeure très faible pour le traitement 2 entre le temps initial et la 14<sup>e</sup> semaine (< 40 %) et augmente à la 20<sup>e</sup> semaine pour atteindre 91 %. La toxicité demeure constante dans le sol sans traitement (5) du temps initial à la 14<sup>e</sup> semaine et diminue à la 20<sup>e</sup> semaine en atteignant 79 % de biomasse totale.



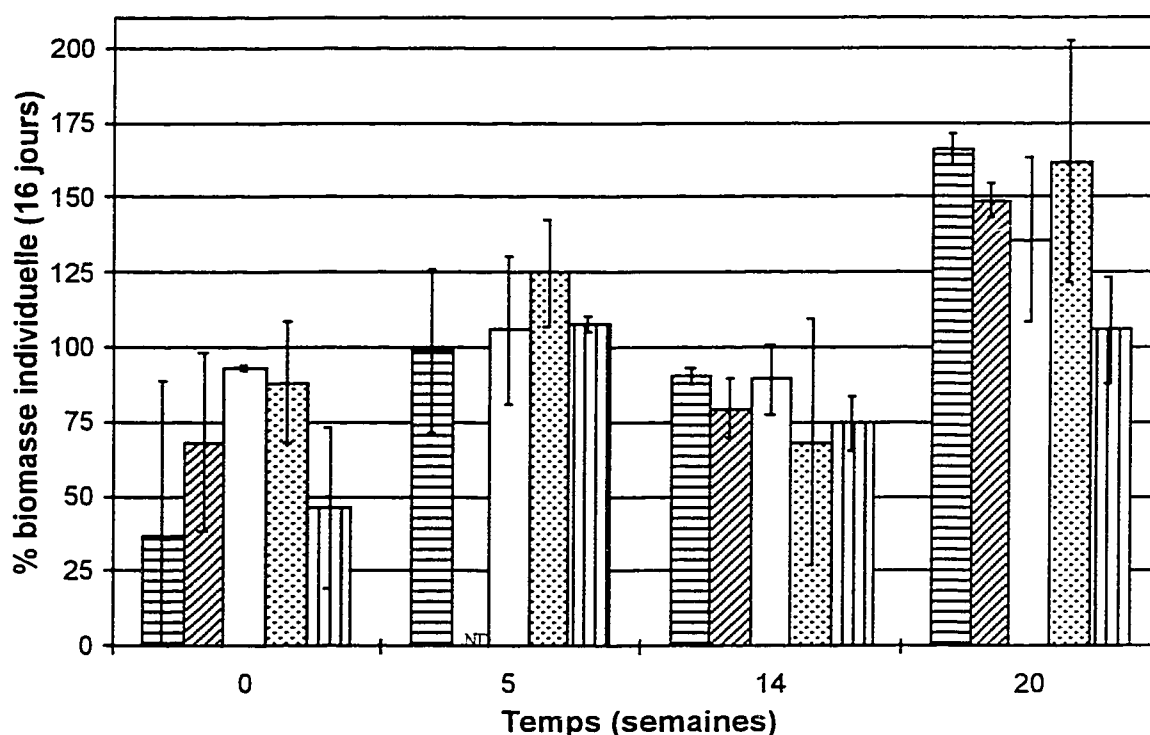
**Figure 5.14: Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de biomasse totale du cresson *Lepidium sativum*, après 16 jours d'incubation.**  
**■ Traitement 1 :** sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **▨ Traitement 2 :** sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **□ Traitement 3 :** sol biostimulé (bran de scie et MSM), **▤ Traitement 4 :** sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et **▥ Traitement 5 :** sol sans traitement. **ND :** Non-disponible. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

La biomasse totale est inférieure à celle du témoin au trois premiers points d'échantillonnage, puisqu'elle est semblable à celle du témoin à la 20<sup>e</sup> semaine du traitement. Ainsi, la biomasse totale des pousses est limitée dans les échantillons analysés au début du traitement et elle est comparable à celle du témoin (sol non contaminé) à la fin du traitement. Ces résultats indiquent une diminution de la toxicité après les 20 semaines de traitement.

Les différences observées ne semblent pas significatives entre les traitements au temps initial et à la 5<sup>e</sup> semaine, quoiqu'il y ait une légère différence entre les traitements 3 et 5 à la 5<sup>e</sup> semaine. Après 14 semaines, la biomasse totale est différente entre les traitements 1, 3 et 4 et le traitement 5. Il semble donc que l'ajout de nutriment, de bran de scie et du champignon diminue la toxicité au cours du biotraitement lorsqu'on les compare au sol sans traitement. Après les 20 semaines de traitement, la toxicité mesurée dans chaque traitement redevient comparable d'un traitement à l'autre. Cependant, puisque la biomasse totale passe d'environ 30 % à 90 %, la toxicité du sol contaminé a diminuée au cours de tous les traitements.

Le traitement du sol par l'ajout des différents amendements contribue à la diminution transitoire et finale de la toxicité du sol contaminé (traitements 1, 3 et 4). L'essai de croissance du cresson exprimé à l'aide de la biomasse totale ne permet pas de dissocier l'effet synergique des différents amendements sur la détoxification du sol puisqu'il n'y a pas de différence entre les traitements à chaque période mesurée. Cependant, étant donné qu'aucune différence de toxicité n'a été mesurée entre les traitement 1, 3 et 4, et que le MSM est commun à tout ces traitements, le MSM semble avoir une influence sur la diminution de la toxicité. On sait que les nutriments (azote, phosphore, ...) sont essentiels pour la croissance des plantes. La présence de ces nutriments dans le MSM utilisé pourrait expliquer les résultats obtenus. En effet, la présence des nutriments pourrait améliorer la fertilité du sol et ainsi augmenter la croissance de la plante. Une telle augmentation a été remarquée par Renoux (1995) dans un sol biotraité par l'ajout de nutriment. Ainsi, la diminution de la toxicité ne peut être directement relié à la détoxification du sol mais pourrait être une combinaison entre l'augmentation de la fertilité du sol et sa détoxification.

Au cours du traitement il est apparu que la biomasse individuelle ajoutait des éléments d'information à la biomasse totale. La figure 5.15 en présente les résultats. Rappelons que la biomasse individuelle est le rapport entre la biomasse totale et le nombre de graines duquel la plante a effectivement poussé après une incubation de 16 jours par rapport au témoin.



**Figure 5.15: Évolution de la toxicité au cours de différents traitements exprimée en terme de biomasse individuelle du cresson *Lepidium sativum*, après 16 jours d'incubation.** **Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM), **Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et **Traitement 5** : sol sans traitement. ND : Non-disponible. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

La toxicité est demeuré constante du temps initial à la 14<sup>e</sup> semaine et a diminué après les 20 semaines pour les traitements 1 et 2, et ce en considérant la variabilité représentée par

les écarts-type. En ce qui a trait aux traitements 3 et 4, la toxicité semble y demeurer constante tout le long des 20 semaines. Pour ce qui est du sol sans traitement (5), la toxicité est semblable entre le temps initial et la 14<sup>e</sup> semaine et entre la 5<sup>e</sup> et la 20<sup>e</sup> semaine.

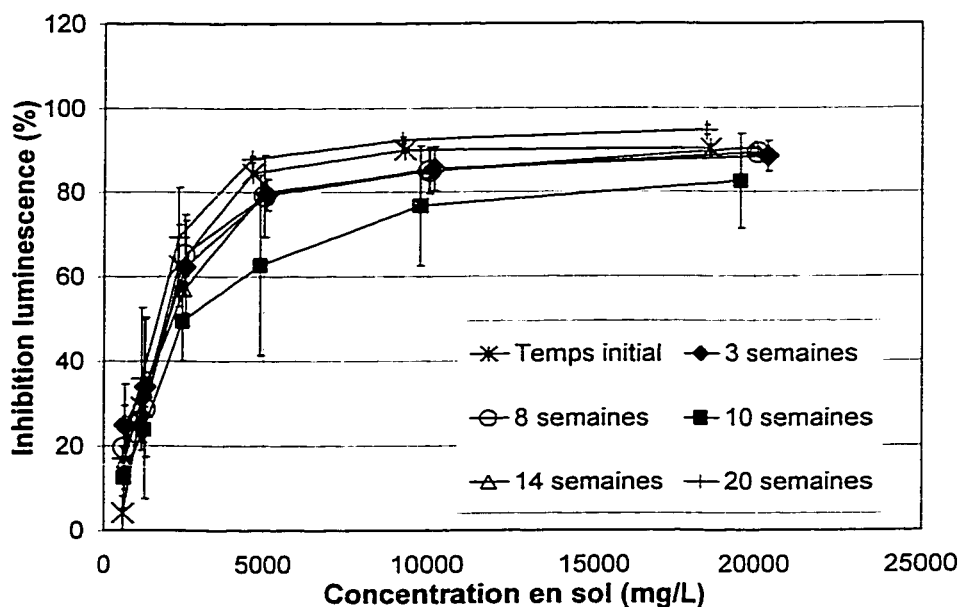
L'évaluation de la croissance du cresson à l'aide de la biomasse individuelle n'indique aucune différence notable entre les différents traitements aux trois premières périodes d'échantillonnage, et ce en considérant la variabilité entre les duplicats. Cependant, au dernier point d'échantillonnage, le pourcentage de biomasse individuelle des traitements 1 et 2 est plus élevé que celui du sol sans traitement (5). Toutefois, à l'instar des résultats obtenus de la biomasse totale, ceux de la biomasse individuelle sont très près de ceux du témoin (pourcentage  $\geq 100\%$ ) dès la 5<sup>e</sup> semaine et même supérieurs après les 20 semaines de traitement. Ainsi, les graines qui ont surmonté l'inhibition de la germination et de l'émergence ont mieux poussées que dans le sol témoin.

On constate donc qu'un même sol peut affecter une même espèce de façon différente. En effet, d'une part il peut avoir un effet inhibiteur sur la germination de la plante, d'autre part il peut stimuler la croissance des pousses. Par ailleurs, cet effet avait déjà été constaté lors d'essais de toxicité sur la germination et la croissance de l'orge (Renoux, 1995).

#### **5.2.4.3 Essai de toxicité Microtox® en phase solide sur la bactérie luminescente *Vibrio fischeri***

Les résultats obtenus de l'essai Microtox® en phase solide sur la bactérie luminescente *Vibrio fischeri* sont présentés à la figure 5.16.





**Figure 5.16: Inhibition d'émission de lumière, mesurée par le Microtox® en phase solide, dans les sols contaminés provenant du traitement 1 pendant le biotraitement.** (Les résultats représentent la moyenne de deux répliquats et les barres d'erreur l'écart-type de ces répliquats).

Ces résultats montrent qu'il n'y a aucune évolution de la toxicité dans le sol amendé avec l'inoculum de *P. chrysosporium* (traitement 1) au cours du biotraitement. La même tendance est observée pour tous les autres traitements (résultats présentés en annexe). Les bactéries luminescentes sont très sensibles aux contaminants toxiques dans le test en phase solide à cause de la faible solubilité des HAP (Baud-grasset *et al.*, 1994). C'est probablement une des raisons pour laquelle aucune détoxification n'est perçue par ce test à l'instar des autres essais de toxicité utilisés.

Les essais de toxicité effectués indiquent plusieurs tendances. D'une part, l'essai sur le ver *Eisenia foetida* montre une réduction transitoire de la toxicité après 5 et 14 semaines qui est loin de se confirmer après 20 semaines de traitement. Le pourcentage de mortalité a permis d'évaluer les effets létaux des échantillons de sol provenant des divers traitements. Bien que ce paramètre soit réputé comme étant peu sensible, on obtient une

mortalité supérieure à 70 % après 20 semaines de traitement. Ces résultats indiquent donc que le sol contaminé n'est pas détoxifié après 20 semaines de traitement. D'autre part, l'essai sur le cresson *Lepidium sativum* montre globalement une réduction de la toxicité. Les mesures de la germination après 4 jours et de l'émergence après 16 jours montrent aussi une réduction transitoire de la toxicité. Les mesures des biomasses totales et individuelles montrent que les plantes ayant surmonté l'inhibition de la germination et de l'émergence poussent mieux que dans le témoin. La stabilité de la toxicité dans l'essai Microtox® et les résultats obtenus des autres essais montrent l'importance d'utiliser une batterie d'essai lors d'une évaluation écotoxicologique. En effet, l'utilisation d'un seul essai de toxicité ne peut être suffisant pour déterminer les risques écotoxicologiques d'une contamination (Marwood *et al.*, 1998).

Les essais de toxicité effectués ont montré que l'utilisation spécifique de *P. chrysosporium* ne conduit pas à une augmentation de la toxicité durant les 20 semaines de traitement. De plus, la biostimulation par ajout de nutriments (MSM) semble un des facteurs ayant la plus grande influence sur la détoxification du sol. En effet, la diminution de la toxicité est obtenue dans les sols ayant été biostimulés par l'ajout de MSM et ne l'est pas dans le sol sans traitement. La variabilité entre les duplicats d'un même traitement a été très élevée, surtout pour l'essai utilisant le cresson *Lepidium sativum*, et ce, même lors de l'analyse au temps initial. Dans certains cas, il a été ainsi difficile de faire la distinction entre les effets causés par les divers traitements. Les systèmes biologiques de traitement de sol sont peu prévisibles et possèdent une variabilité élevée. En effet, le sol est une matrice hétérogène où la répartition et l'activité des micro-organismes ne sont pas uniformément répartis, et ce, malgré une homogénéisation initiale. Les résultats obtenus des différents réplicats, lors des essais de toxicité, montrent qu'il serait adéquat de réaliser un plus grand nombre de réplicats et de réaliser une analyse statistique afin de permettre une évaluation plus claire et objective.

### **5.2.5 Évolution de la concentration des HAP et C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> dans le sol contaminé à l'étude lors de son traitement**

Cette section présente les résultats du suivi chimique temporel des HAP et des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements. À quatre reprises des échantillons composites de sol ont été prélevés dans les 11 réacteurs et les concentrations en HAP et en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> ont été quantifiées par l'entremise du laboratoire externe accrédité (voir sections 5.1.2 et 5.1.4).

#### **5.2.5.1 Contrôle de la qualité des analyses du laboratoire externe**

Un contrôle de la qualité des analyses chimiques a été réalisé par le laboratoire externe. Il permet d'obtenir une mesure de la qualité des analyses effectuées. Ce contrôle a été réalisé par l'ajout dosé de 3 HAP soit le D10-anthracène, le D10-pyrène et le D12-benzo(a)pyrène dans chacun des échantillons analysés. Dans le cas où la récupération de ces ajouts dosés est inférieure à celle prescrite par la carte de contrôle du laboratoire, l'analyse des échantillons est reprise. Dans le cas où la reprise des analyses est impossible, le pourcentage de récupération obtenu doit être considéré dans l'analyse des résultats. Comme spécifié à la section 5.2.2, l'analyse initiale de 22 échantillons a permis d'établir une moyenne de récupération et un écart-type (é.t.). Suite à cette analyse, il a été établi que la récupération des ajouts dosés devait s'échelonner entre la moyenne et  $\pm 2$  é.t.. La figure 5.17 présente le pourcentage de récupération des 3 HAP pour quatre analyses effectuées après 0, 5, 14 et 20 semaines de traitement. À cette figure, la moyenne de récupération déterminée à l'étape de validation est indiquée en plus des écart-types ( $\pm 1$  é.t.,  $\pm 2$  é.t.,  $\pm 3$  é.t.).

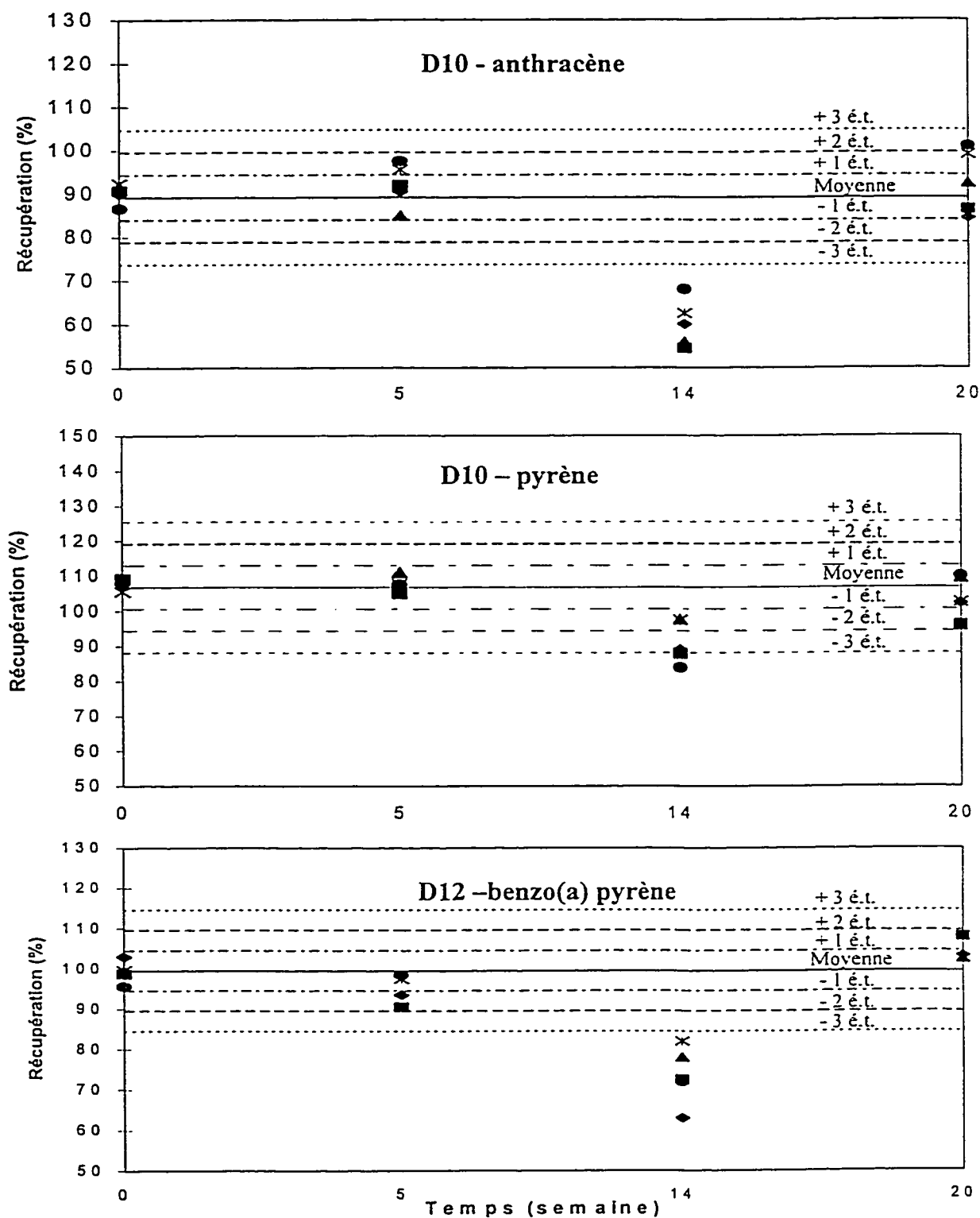
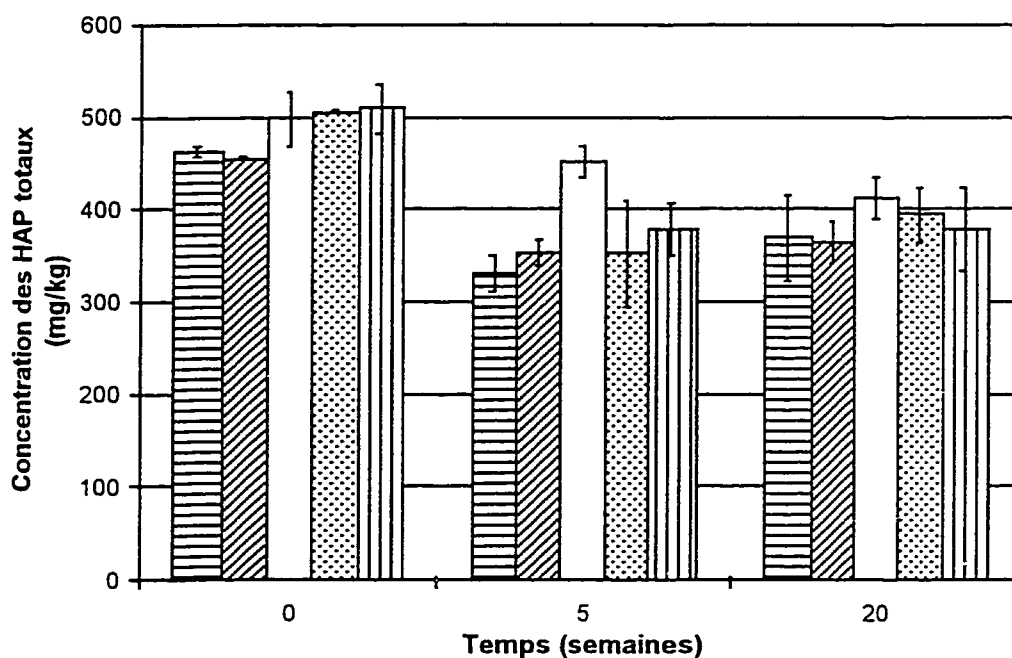







Figure 5.17: Récupération du D10-anthracène, du D10-pyrène et du D12-benzo(a)pyrène suite à l'ajout dosé effectué par le laboratoire externe pour les analyses effectuées après 0, 5, 14 et 20 semaines de traitement. (5 réplicats).

Les analyses réalisées au temps initial (semaine 0), à la 5<sup>e</sup> semaine et à la 20<sup>e</sup> semaine répondent au critère d'acceptabilité qui avait été fixé au départ, puisque tous les pourcentages de récupération se situent dans l'intervalle  $\pm 2$  é.t.. À la 14<sup>e</sup> semaine, les récupérations du D10-anthracène et du D12-benzo(a)pyrène sont inférieures à 3 é.t. pour tous les traitements. Pour ce même point d'échantillonnage, la récupération du d10-pyrène est située à l'intérieur de la plage d'acceptabilité. Il est possible de corriger la concentration des HAP étudiés par les valeurs de récupération obtenues afin de normaliser les récupérations à 100 %. Cette façon de faire a été rejetée car l'écart étant trop élevé les corrections obtenues seraient trop importantes. Bien que les 3 HAP dosés soient représentatifs des 3, 4 et 5 anneaux, la correction des concentrations des HAP non dosés entraîne également une erreur. Les résultats de l'échantillonnage de la 14<sup>e</sup> semaine ne sont donc pas considérés dans l'analyse.

#### **5.2.5.2 Concentration résiduelle des HAP totaux**

La figure 5.18 présente la concentration résiduelle en HAP totaux (pour les 9 HAP suivis) dans tous les traitements étudiés aux trois temps d'échantillonnage retenus. Au cours des différents traitements, la concentration en HAP totaux a diminué en moyenne de 21 % mais demeure au-dessus du critère C après 20 semaines de traitement. La diminution est similaire pour tous les traitements, à l'exception du traitement 3 dont la concentration est légèrement supérieure à la semaine 5. Les concentrations sont semblables entre l'échantillonnage de la 5<sup>e</sup> semaine et de la 20<sup>e</sup> semaine.



**Figure 5-18 : Évolution de la concentration en HAP totaux durant le traitement.**  **Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM),  **Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM),  **Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM),  **Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et  **Traitement 5** : sol sans traitement. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

L'aération, le contenu en eau et le pH ont été suivis lors des traitements. L'aération a été maintenue à un taux minimum de  $0,1 \text{ m}^3$  d'air/ $\text{m}^3$  de sol/heure durant toute la durée de l'expérience. Grâce au contenant répartiteur, l'aération a été également distribuée dans tous les réacteurs. Le contenu en eau a été ajusté de façon hebdomadaire à l'aide d'eau distillée afin de la maintenir à 25 % (p/p) dans les traitements 1, 2, 3 et 4 et à son pourcentage initial de 21 % dans le sol sans traitement (traitement 5). Le sol amendé avec du bran de scie s'asséchait plus rapidement, l'humidité y a donc été ajustée plus régulièrement. Enfin, le pH est demeuré près de la neutralité dans tous les traitements durant toute l'expérience.

Bien que *P. chrysosporium* soit reconnu pour sa capacité à dégrader les composés xénobiotiques, dont les HAP, sa présence dans le traitement 1 n'améliore pas la diminution de la concentration résiduelle en HAP totaux. La contamination présente dans le sol étudié date de plusieurs années. Il est donc possible que la diminution des concentrations résiduelles dans les cinq premières semaines soit associée à la biodégradation des HAP les plus volatils, plus solubles et masse molaire plus faible et que des facteurs physico-chimiques limitent la dégradation plus poussée des HAP totaux de masse molaire plus élevée non biodégradés durant les premières semaines. Toutefois, le champignon à l'aide de son système enzymatique extracellulaire devrait passer outre de telles limitations (Barr et Aust, 1994). Étant donné qu'aucune observation qualitative du champignon n'était possible (incapacité d'observation visuelle), la présence et l'activité du champignon dans le traitement amendé a dû être étudiée. En ce sens, un échantillonnage de tous les traitements a été réalisé à la 12<sup>e</sup> semaine du traitement afin de réaliser une étude qualitative de décoloration du Poly-R sur pétri. Une décoloration du colorant Poly-R a été notée dans les échantillons provenant du traitement 1; le champignon était donc toujours présent et actif dans ce traitement après 12 semaines. Aucune décoloration n'a été détectée dans les échantillons provenant du traitement 2, bien que ce dernier ait été initialement inoculé, ainsi que dans les traitements 3, 4 et 5. Dans ces autres traitements aucun micro-organisme ne possède donc des caractéristiques s'apparentant à celles de *P. chrysosporium*.

Le biotraitement par épandage d'un sol contaminé aux HAP, réalisé par Haught *et al.* (1995) montre que l'utilisation du champignon n'améliore pas la disparition des HAP comparativement à l'utilisation de nutriments sans ajout du champignon. Une autre étude effectuée sur la biodégradation des HAP par *P. chrysosporium* montre une disparition d'environ 85 % des HAP totaux comparativement à 55 % dans le traitement sans champignon après seulement 8 semaines de traitement (Baud-Grasset *et al.*, 1994). Une étude réalisée par Tucker *et al.* (1995), montre que l'action de *P. chrysosporium* sur la

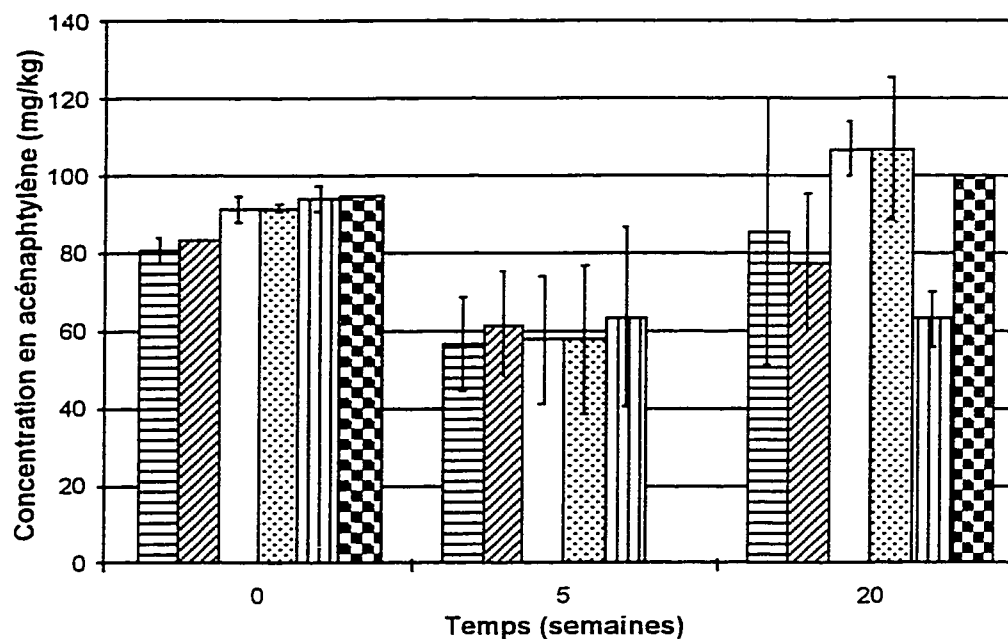
biodégradation des composés organiques peut être supprimée autant par les micro-organismes indigènes que par la composition du sol. Ces résultats et ceux de la présente étude montrent que malgré tous les avantages reliés à l'utilisation du champignon de type carie blanche, la complexité des mécanismes utilisés par ces champignons pourrait être un frein à son utilisation pour la biorestauration des sols contaminés.

### **5.2.5.3 Concentration résiduelle des HAP de 3 anneaux**

La concentration résiduelle d'acénaphtylène au temps initial, à la 5<sup>e</sup> semaine et à la 20<sup>e</sup> semaine est présentée à la figure 5.19. Les autres HAP de 3 anneaux ont une concentration initiale inférieure au critère C et trop près de la limite de détection pour faire l'objet d'un suivi.

La concentration en acénaphtylène demeure constante pour tous les traitements durant la période de 20 semaines. La variation entre les duplicats semble augmenter au cours du traitement surtout pour les traitements inoculés avec le champignon (1 et 2). Il est reconnu que la biodégradation dépend de la masse molaire et de la solubilité des HAP (Sims *et al.*, 1989). Ainsi, la dégradation des HAP de 3 anneaux est plus rapide que les HAP possédant un plus grand nombre d'anneaux aromatiques. La biodégradation des HAP de 3 anneaux pourrait être masquée par les grands écarts-type. La concentration d'acénaphtylène étant constante dans le témoin abiotique cela dénote qu'aucune dégradation due à des facteurs physico-chimiques n'a eu lieu.



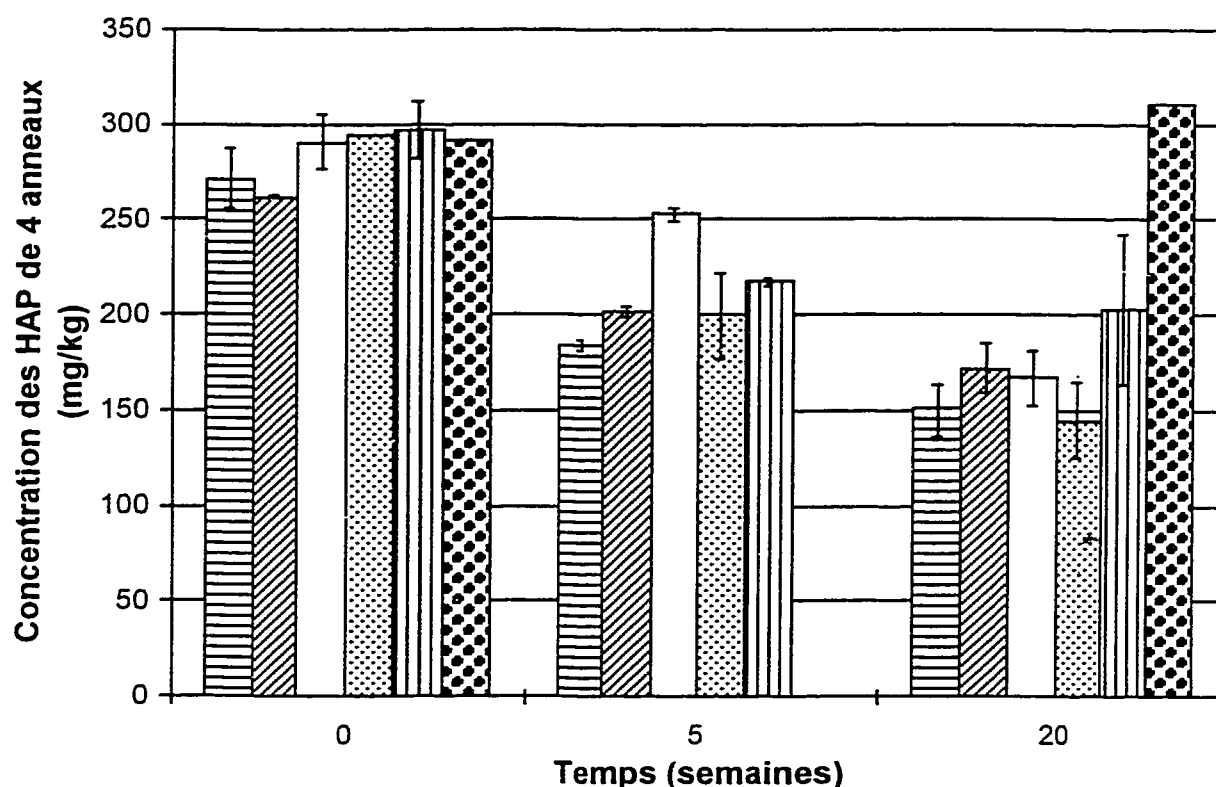


**Figure 5-19 : Biodégradation de l'acénaphthylène dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements.** **Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM), **Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et **Témoin abiotique**. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

L'augmentation de la variabilité entre les duplicats pourrait expliquer la légère diminution et l'augmentation successive notée après 20 semaines de traitement. Ainsi, en plus de la complexité de la structure chimique des HAP, les propriétés physico-chimiques associées à la matrice de sol peuvent limiter la biodégradation des HAP (Seech et al., 1992). En effet, le sol constitue une matrice où la répartition des micro-organismes n'est pas uniformément répartis. De plus, durant le biotraitement on note que cette hétérogénéité tend à augmenter et pourrait ainsi être un facteur limitant pour l'évaluation de la biodégradation de l'acénaphthylène.

#### 5.2.5.4 Concentration résiduelle des HAP de 4 anneaux

La figure 5.20 présente la concentration résiduelle des HAP possédant 4 anneaux (fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène et chrysène) en fonction du temps de traitement.



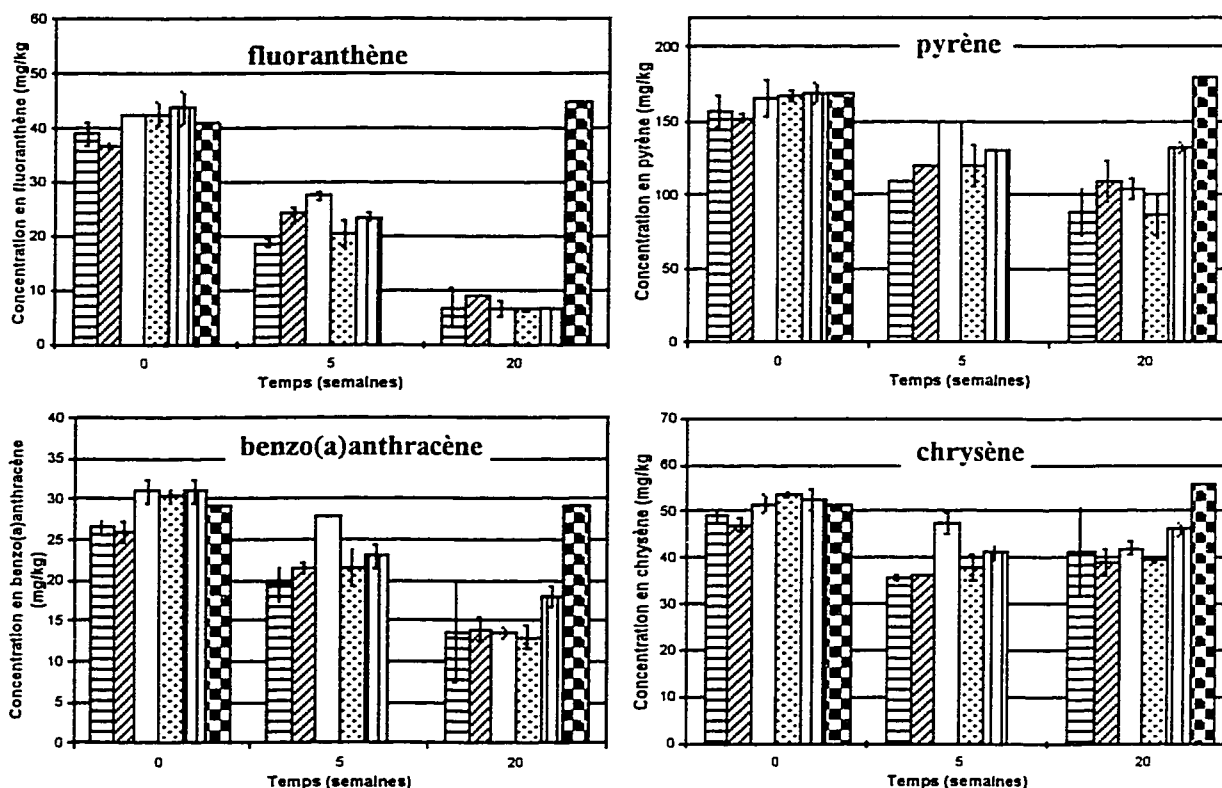
**Figure 5-20 : Biodégradation des HAP formés de 4 anneaux dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements.** **Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM), **Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et **Traitement 5** : sol sans traitement, **Témoin abiotique**. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

La diminution de la concentration notée dans tous les traitements après 5 semaines de traitement est confirmée après 20 semaines. La concentration diminue de près de la moitié entre le temps initial et la 20<sup>e</sup> semaine de traitement. La concentration finale est

légèrement plus élevée dans le sol n'ayant pas reçu de traitement (traitement 5) que dans les autres traitements.

La figure 5.21 présente les concentrations initiales et résiduelles en fluoranthène, en pyrène, en benzo(a)anthracène et en chrysène. Les résultats montrent que la concentration résiduelle en fluoranthène est inférieure à 10 mg/kg après 20 semaines de traitement, et ce pour tous les traitements. Cette diminution en fluoranthène correspond à une élimination moyenne de 83 % de ce HAP pour l'ensemble des traitements. Pour le pyrène, la biodégradation obtenue en 20 semaines a permis d'amener la concentration résiduelle à près de 100 mg/kg pour tous les traitements à l'exception du sol sans traitement (traitement 5). Le pourcentage d'élimination du pyrène est de 44, 28, 37, 49 et 22 % pour les traitements 1, 2, 3, 4 et 5 respectivement.

Les résultats montrent que tous les traitements ont un effet positif par rapport au sol seul (traitement 5) sur la biodégradation du benzo(a)anthracène. Les concentrations résiduelles en benzo(a)anthracène sont inférieures à 15 mg/kg après 20 semaines pour tous les traitements à l'exception du traitement 5 (18 mg/kg). La concentration résiduelle en chrysène après 5 semaines est en moyenne de 38 mg/kg (traitement 1, 2, 4 et 5) et de 48 mg/kg (traitement 3) et elle est demeurée presque constante durant la période de traitement de 20 semaines.



**Figure 5-21 : Biodégradation du fluoranthène, du pyrène, du benzo(a)anthracène et du chrysène dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements.** **Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM), **Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et **Témoin abiotique**. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

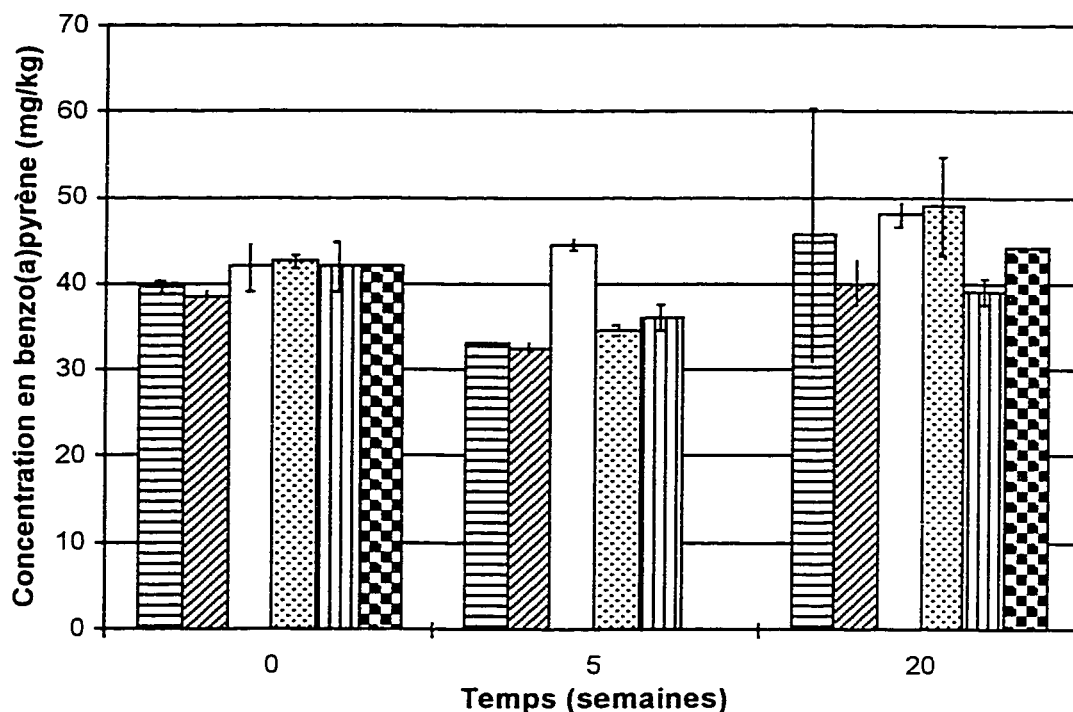
La biodégradation du fluoranthène a été plus importante que celle du pyrène, du benzo(a)anthracène et du chrysène. Il est intéressant de constater que la biodégradation suit la même tendance que la solubilité (solubilité fluoranthène > solubilité pyrène > solubilité benzo(a)anthracène > solubilité chrysène). La biodégradation des HAP formés de 4 anneaux, après 20 semaines de traitement, est semblable dans tous les traitements étudiés. Ce résultat est différent de ce qui avait été obtenu par Baud-Grasset *et al.* (1994). En effet, dans leur étude le pourcentage d'élimination des HAP formés de 4 anneaux était de 79 % dans les sols ayant été amendé avec *P. chrysosporium* (12 % v/v) alors qu'il

n'était que de 22 % dans le sol sans traitement (contrôle) après 8 semaines. Après 5 semaines de traitement, la biodégradation notée dans le traitement 3 est toujours inférieure à celle des autres traitements. La concentration résiduelle dans le témoin abiotique est demeurée constante entre le temps initial et la 20<sup>e</sup> semaine de traitement. Ce contrôle a permis de s'assurer que la diminution notée au cours de l'expérience était bien due à la présence des micro-organismes et donc reliée au phénomène de biodégradation.

L'addition de l'inoculum de *P. chrysosporium* n'améliore pas la dégradation des HAP de 4 anneaux par rapport à l'addition de nutriments seuls, si on compare le traitement 1 au traitement 4. Ainsi, il apparaît que l'ajout de MSM seul permet d'obtenir une diminution de la concentration résiduelle pour ces HAP.

#### **5.2.5.5 Concentration résiduelle des HAP de 5-6 anneaux**

Les 20 semaines de traitement n'ont pas été suffisantes pour assurer la biodégradation des HAP formés de 5-6 anneaux. La figure 5.22 présente les résultats obtenus pour le benzo(a)pyrène, le HAP le plus étudié de cette catégorie. La présence de *P. chrysosporium* n'a pas apportée d'amélioration notable à la biodégradation de ce HAP malgré la capacité de son système enzymatique non spécifique (Barr et Aust, 1994; Bumpus *et al.*, 1985; Haemmerli *et al.*, 1986).



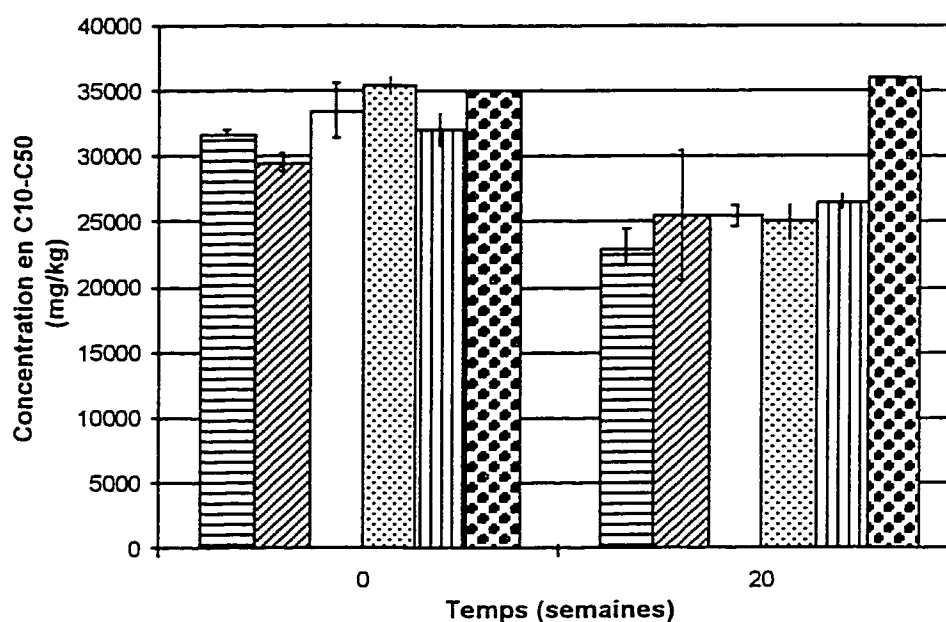
**Figure 5-22 : Biodégradation du benzo(a)pyrène dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements.** **Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM), **Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et **Témoin abiotique**. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

Les résultats obtenus montrent que les concentrations résiduelles demeurent très constantes et que les écart-types entre les duplicats sont assez faibles. La variabilité analytique est donc très faible dans l'analyse de HAP de masse molaire élevée comme le benzo(a)pyrène.

#### 5.2.5.6 Concentration résiduelle des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>

La figure 5.23 présente les concentrations résiduelles des hydrocarbures pétroliers (chaînes hydrocarbonées de C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>). Tous les traitements ont eu un effet positif par rapport au sol

sans traitement sur la biodégradation des  $C_{10}$ - $C_{50}$ . Après 20 semaines, les concentrations résiduelles sont inférieures à 25 000 mg/kg pour les quatre premiers traitements alors qu'il est demeuré à environ 35 000 mg/kg pour le sol sans traitement. La concentration résiduelle du témoin abiotique est demeurée constante entre le début de l'expérience et la 20<sup>e</sup> semaine du traitement. Les facteurs physico-chimiques ne contribuent donc pas à la dégradation des hydrocarbures. De plus, la variabilité analytique de l'analyse des hydrocarbures pétroliers est assez faible.



**Figure 5-23: Concentration résiduelle en  $C_{10}$ - $C_{50}$  dans le sol contaminé à l'étude en fonction des différents traitements.** **Traitement 1** : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 2** : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), **Traitement 3** : sol biostimulé (bran de scie et MSM), **Traitement 4** : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et **Témoin abiotique**. (Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).

La concentration en hydrocarbures demeure très élevée malgré les 20 semaines de traitement. D'une part, ce niveau de contamination pourrait limiter la biodégradation.

D'autre part, puisque qu'une réduction moyenne de 24 % a été obtenue suite à la bioaugmentation et la biostimulation du sol contaminé à l'étude, il apparaît que les 20 semaines amorcent la biodégradation mais sont insuffisantes pour décontaminer entièrement le sol à l'étude.

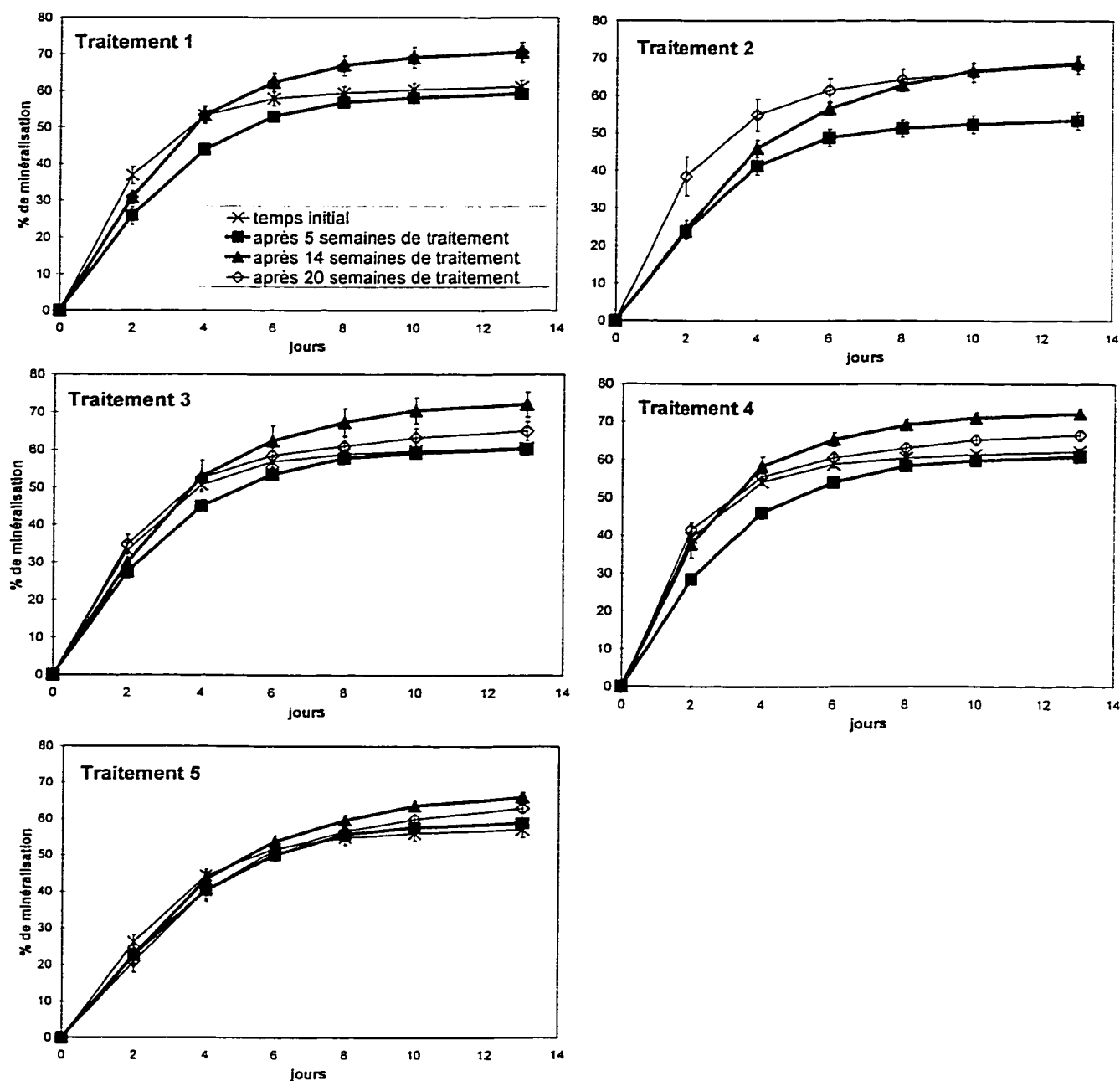
#### **5.2.5.7 Comparaison temporelle de la minéralisation du phénanthrène dans les différents traitements**

La figure 5.24 présente la minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène pour tous les traitements après 0, 5, 14 et 20 semaines. Pour chaque échantillon analysé, l'essai de minéralisation a été effectuée sur une période de 13 jours.

La minéralisation du phénanthrène radioactif augmente entre la 5<sup>e</sup> et la 20<sup>e</sup> semaine dans tous les traitements. Cette augmentation est de l'ordre de 20 % dans les traitements 1 et 2 et n'est que de 10 % dans les traitements 3, 4 et 5. Dans ces derniers traitements une diminution de la minéralisation est notée entre la 14<sup>e</sup> et la 20<sup>e</sup> semaine. Les écart-types calculés sur les triplicats sont inférieurs à 1 % pour tous les traitements. Le témoin abiotique est demeuré stérile sur toute la durée de l'expérience puisque la minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène dans les échantillons testés est demeurée inférieure à 1 %.

La comparaison des traitement 1 et 3 montre une différence de 10 % de la minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène après 20 semaines de traitement. Étant donné que la seule différence entre ces traitements est la présence de *P. chrysosporium*, il semble donc que sa présence améliore le potentiel de biodégradation.





**Figure 5-24 : Minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -phénanthrène dans le sol contaminé à l'étude au temps initial, à la 5<sup>e</sup>, 14<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> semaine de traitement. Traitement 1 : sol bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), Traitement 2 : sol stérilisé bioaugmenté (*P. chrysosporium* sur support de bran de scie et MSM), Traitement 3 : sol biostimulé (bran de scie et MSM), Traitement 4 : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM) et Traitement 5 : sol sans traitement (Les résultats représentent la moyenne de trois réplicats et les barres d'erreur l'écart-type de ces réplicats).**

### 5.2.6 Comparaison des résultats obtenus du suivi biologique et chimique

Durant le traitement du sol, il y a eu une baisse transitoire de la toxicité décelée avec les essais sur la mortalité du ver de terre et la germination et l'émergence du cresson. Cependant, les paramètres de mesures de biomasse totale et individuelle dans l'essai de croissance du cresson montrent une diminution de la toxicité sur toute la durée du traitement. Cette détoxification partielle a été accompagnée d'une faible réduction de la contamination en terme de concentration en HAP totaux. Le pourcentage d'élimination moyen est d'environ 21 % en HAP totaux pour l'ensemble des traitements. Cette réduction est en majeure partie due aux HAP formés de 4 anneaux soit, le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)anthracène. La concentration résiduelle après les 20 semaines pour les 4 premiers traitement était inférieure à 10 mg/kg pour le fluoranthène, d'environ 100 mg/kg pour le pyrène et d'environ 15 mg/kg pour le benzo(a)anthracène. Il est reconnu que la toxicité des HAP augmente avec le nombre d'anneaux qu'ils contiennent. Ainsi, la réduction de toxicité, notée lors des essais, semble reliée à la réduction de concentration des HAP de 4 anneaux. De plus la réduction de la concentration résiduelle en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> pourrait avoir eu une influence sur la réduction de la toxicité. En effet, une diminution de plus de 5 000 mg/kg a été notée pour tous les traitements.

L'ajout de nutriments, de bran de scie et d'un inoculum de *P. chrysosporium* conduit à une diminution de la toxicité et à une diminution de la concentration en HAP. Cependant, la présence spécifique de *P. chrysosporium*, sans être néfaste, ne diminue pas la toxicité par rapport au traitement sans champignon et n'améliore pas la biodégradation des HAP durant un traitement de 20 semaines.

Il est intéressant de constater que la tendance observée par le suivi biologique concorde avec celle du suivi chimique. Ainsi, suite à ces deux évaluations il apparaît que seul le MSM a une influence sur la diminution de la toxicité et sur la disparition des HAP. En

effet, le MSM est la base commune de tous les traitements et aucune différence de toxicité ou de concentration résiduelle n'a été mesurée entre ces traitements.

Les essais biologiques utilisés au cours du biotraitement s'avèrent des outils pertinent pour l'évaluation de la détoxification du sol. En effet, les résultats obtenus de ces essais concordent avec les résultats obtenus du suivi chimique.

### 5.3 Conclusions

L'évaluation écotoxicologique effectuée après l'ajout des différents amendements (MSM, bran de scie et inoculum de *P. chrysosporium*) a permis de démontrer que ces ajouts diminuent la toxicité initiale du sol contaminé. L'évaluation écotoxicologique initial a aussi permis de mettre en évidence plusieurs points :

- le ver *Eisenia foetida* est très sensible à la contamination du sol à l'étude (mortalité supérieure à 70 %);
- la germination du cresson (sur 4 jours) est fortement inhibée par son contact avec le sol (germination inférieure à 40 %) et les réponses obtenues varient beaucoup d'un réplicat à l'autre;
- la croissance du cresson (sur 16 jours) est inhibée par son contact avec le sol contaminé mais le degré d'inhibition varie selon le paramètre de mesure utilisé (émergence des pousses, biomasse totale, biomasse individuelle).

Les résultats de l'évaluation écotoxicologique et chimique ont pu être reliés aux différentes composantes d'un traitement biologique contrôlé. En ce sens, il est apparu que la présence de nutriments a une plus grande influence sur la détoxification et sur la biodégradation des HAP que celle du bran de scie ou de l'inoculum de *P. chrysosporium* utilisé. De plus, le suivi biologique a permis de constater que l'application d'un inoculum

de *P. chrysosporium* ne conduit pas à une augmentation supplémentaire de la toxicité du sol. Les résultats de l'étude montrent également que les essais biologiques utilisés au cours du biotraitement s'avèrent des outils pertinent pour l'évaluation de la détoxification du sol.

Enfin, les 20 semaines de traitement semblent insuffisantes pour détoxifier et décontaminer le sol à l'étude sous les critères de décontamination prescrits par le MEF.

## CHAPITRE VI

### CONCLUSION GÉNÉRALE ET RECOMMANDATIONS

---

La réalisation d'un inoculum en laboratoire a permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle la présence d'une solution nutritive améliore la croissance de *P. chrysosporium* sur la base solide utilisée pour la préparation de l'inoculum. La solution nutritive optimale trouvée avait une forte teneur en azote (C/N/P : 10,08/1,58/0,2 g/L). De plus, la bioaugmentation d'un sol artificiellement contaminé au phénanthrène à l'aide de l'inoculum de *P. chrysosporium* préparé n'a pas amélioré la minéralisation de ce composé.

La caractérisation écotoxicologique du sol contaminé à l'étude a été effectuée à l'aide de 3 essais de toxicité par contact direct (mortalité du ver *Eisenia foetida*, germination et croissance du cresson *Lepidium sativum*) et par l'essai Microtox® en phase solide sur la bactérie luminescente *Vibrio fischeri*. La contamination du sol avant traitement était largement supérieure au critère C du MEF (200 mg/kg), se chiffrant à environ 488 mg/kg en HAP totaux (pour les 9 HAP suivis).

Le suivi biologique a permis de confirmer que *P. chrysosporium*, par sa seule présence, n'induit pas une hausse de la toxicité et que la transformation des HAP par le champignon ne conduisait pas à une augmentation de la toxicité globale du sol au cours de son traitement. Néanmoins, sa présence n'améliore pas la détoxification et la biodégradation des HAP contenus dans le sol à l'étude malgré ses qualités reconnues.

Des différents amendements étudiés (champignon, bran de scie et nutriments), il est apparu que l'ajout de nutriment avait la grande influence sur la détoxification. Les nutriments peuvent affecter la toxicité par l'augmentation de la fertilité du sol,

l'inhibition ou l'amélioration de l'activité microbienne ou par exemple par des modifications de la biodisponibilité.

L'évaluation écotoxicologique est un outil fiable pour évaluer l'efficacité de détoxification lorsqu'on utilise une batterie d'essai de toxicité. Cependant, elle ne permet pas de séparer la toxicité intrinsèque du sol à celle causée par la contamination initiale, les métabolites, les modifications de biodisponibilité. La mise en place du plan expérimental avait pour but de passer outre cette limite. En effet, les différents traitements ont été réalisés sur une même matrice de sol et étaient l'un par rapport à l'autre des contrôles. Malgré le fait qu'on ne peut séparer la toxicité intrinsèque à celle causée par la contamination, la comparaison de chacun des traitements a permis d'évaluer l'effet des différents amendements sur la détoxification d'un sol contaminé.

Le suivi biologique est un bon outil écotoxicologique pour compléter le suivi chimique. En effet, les résultats obtenus des deux suivis indiquent les mêmes tendances.

Les essais de toxicité ont été effectués à une concentration unique (100 %) afin d'éviter la dilution du sol contaminé. La dilution du sol aurait permis d'obtenir la  $CL_{50}$ , cependant cela a été jugé inadéquat puisque le sol utilisé contenait plusieurs contaminants dont les concentrations pouvait varier tout le long de l'expérimentation. Toutefois, l'évaluation écotoxicologique effectuée de cette façon a rendu la comparaison des résultats des différents essais de toxicité ardue. Plusieurs études rapportées dans la littérature utilisent des témoins négatifs composés de sols non contaminés présentant les mêmes caractéristiques physico-chimiques que le sol analysé. Ces sols sont difficiles à trouver puisque les sols contaminés sont principalement retrouvés dans les zones industrielles où la majorité du sol est contaminé. Il serait à cet égard intéressant de développer un indice de décontamination qui serait fonction de la toxicité initiale du sol contaminé.

La détoxification du sol et la biodégradation des HAP a été très faible sur les 20 semaines. Ce résultat a été principalement relié au type de contamination retrouvé dans le sol utilisé. En effet, le sol contient des HAP et des hydrocarbures pétroliers présents depuis plusieurs années. Cette contamination météorisée peut causer certaines limites d'ordre physico-chimique. L'utilisation d'un sol contaminé par des résidus agés avait été préférée à celle d'un sol reconstitué auquel aurait été ajouté des composés chimiques purs afin de mieux représenter la réalité. Les résultats de la présente étude sont donc une évaluation représentative du suivi biologique et chimique lors d'un biotraitement. Puisque, les 4 mois semblent insuffisant pour traiter le sol de façon biologique, il serait approprié de réaliser le biotraitement d'un sol contaminé par des résidus agés sur une plus longue période. Dans une étude réalisée par Hund et Traunspurger (1994) sur un sol contaminé aux HAP, une mortalité de tous les vers avait été obtenue après 4 mois de traitement et tous les vers survivaient après 7 mois de traitement. La durée d'une étude sur le traitement biologique contrôlé d'un sol contaminé aux HAP devrait donc être d'au moins 7 mois.

Dans la présente étude, en raison des coûts associés aux analyses, il a été décidé de réaliser les 5 traitements en duplicats de façon à dissocier l'effet des différents amendements. Toutefois, l'obtention d'une grande variabilité entre les duplicats a rendu parfois difficile la comparaison des résultats. En ce sens, il est fortement recommandé d'effectuer les traitements sur un minimum de 3 réplicats pour rendre possible la réalisation d'une étude statistique et ainsi améliorer l'interprétation des résultats. Dans les cas où il est impossible d'effectuer l'ensemble du plan expérimental, en raison économique, la réplication devrait l'emporter sur la quantité de traitement à évaluer.

Les résultats ont montrés que l'ajout de nutriment pouvait améliorer la détoxification du sol contaminé. Étant donné la grande importance des nutriments dans le traitement biologique des sols contaminés, les causes de la détoxification apportées par les nutriments demeurent un sujet de recherche à approfondir. En outre, il serait intéressant d'identifier

les populations microbiennes impliquées dans le métabolisme des HAP et de déterminer si l'action de ces micro-organismes est synergique ou antagoniste avec celle spécifique à *P. chrysosporium*. Il serait ainsi possible de prévoir les conséquences d'une bioaugmentation par l'application d'un inoculum de *P. chrysosporium*.

Le suivi biologique permet d'obtenir une réponse globale, qui suit bien celle obtenue du suivi chimique, si une batterie d'essai de toxicité est utilisée. Ce type d'évaluation est de plus en plus utilisé autant dans des recherches que pour prédire l'efficacité d'une technologie environnementale. Il demeure que plusieurs recherches restent à faire afin de réaliser une méthodologie adaptable servant à effectuer le choix des essais à réaliser et pour optimiser l'analyse des résultats.



## RÉFÉRENCES

ATLAS, R. M. et CERNIGLIA, C. E. (1995). Bioremediation of Petroleum Pollutants : Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. BioScience, 45, 332-338.

ANDERSSON, B.E. et HENRYSSON, T. (1996). Accumulation and Degradation of Dead-End Metabolites during Treatment of Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Five Strains of White-rot Fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 46, 647-652.

ATLAS, R.M. et CERNIGLIA, C.E. (1995). Bioremediation of Petroleum Pollutants : Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. BioScience, 45, 332-338.

BARBEAU, C. (1996). Bioaugmentation de sols contaminés au pentachlorophénols par la méthode des sols activés, Mémoire de M.Sc.A., École Polytechnique de Montréal, Canada.

BARR, D.P. et AUST, S.D. (1994). Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants. Environmental Science & Technology, 28, 78A-87A.

BAUD-GRASSET, F., SAFFERMAN, S.I., BAUD-GRASSET, S. et LAMAR, R.T. (1994). Demonstration of Soil Bioremediation and Toxicity Reduction by Fungal Treatment. Bioremediation of Chlorinated and PAH Compounds, Second International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium - San Diego, R.E. Hinchee, A. Leeson, L. Semprini, S.K. Ong, Batelle Press, 2(1), 496-500.

BUMPUS, J.A., TIEN, M., WRIGHT, D. et AUST, S.D. (1985). Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus. Science, 228, 1434-1436.

BUMPUS, J.A. et AUST, S.D. (1987). Biodegradation of Environmental Pollutants by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* : Involvement of the Lignin Degrading System. BioEssays, 16, 166-170.

BUMPUS, J.A. (1989). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 55, 154-158.

CALLAHAN, C.A. et LINDER, G. (1992). Assessment of Contaminated Soils using Earthworm Test Procedures. Ecotoxicology of Earthworms, P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards, F. Heimbach, Intercept, 187-196.

CERNIGLIA, C.E. (1984). Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Advances in Applied Microbiology, 30, 31-71.

CERNIGLIA, C.E., WHITE, G.L. et HEFLICH, R.H. (1985). Fungal Metabolism and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Archives of Microbiology, 143, 105-110.

CERNIGLIA, C.E. (1993). Biodegradation of Polycyclic Hydrocarbons. Environmental Biotechnology, 4, 331-338.

CHEREMISINOFF, P.N. et AOYAMA, H. (1995). High-Hazard Pollutants, Encyclopedia of Environmental Control Technology - volume 7, Houston : Gulf Pu co., 663 p.

COOKSON, J.T Jr. (1995). Bioremediation Engineering : Design and Application, McGraw-Hill, 624p.

DAVIS, M.W., GLASER, J.A., EVANS, J.W. et LAMAR, R.D. (1993). Field Evaluation of the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete sordida* to Treat Creosote-Contaminated Soil. Environmental Science & Technology, 27, 2572-2576.

DESCHENES, L. (1995). Impact des surfactants biologiques et du SDS sur la mobilisation et la biodégradation des HAP contenus dans un sol contaminé a la créosote. Thèse de doctorat, Institut national de recherche, INRS-Eau.

DESCHENES, L., LAFRANCE, P., VILLENEUVE, J.-P. et SAMSON, R. (1996). Adding Sodium Dodecyl Sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 Biosurfactants Inhibits Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation in a Weathered Creosote-Contaminated Soil. Applied Microbiology and Biotechnology, 46, 638-646.

DHAWALE, S.W., DHAWALE, S.S. et DEAN-ROSS, D. (1992). Degradation of Phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* Occurs under Lignolytic as well as Nonlignolytic Conditions. Applied and Environmental Microbiology, 58, 3000-3006.

ENVIRONNEMENT CANADA, FABRI-FORGET, M. et LALONDE, GIROUARD, LETENDRE & ASSOCIÉS (1993a). Rejets de HAP a l'environnement au Canada - 1990. Liste des substance d'intérêt prioritaire : document de support n°1.

ENVIRONNEMENT CANADA, RINGUETTE, S. (1993b). Présence des HAP dans l'environnement canadien : portrait de la situation. Liste des substance d'intérêt prioritaire : document de support n°2.

ENVIRONNEMENT CANADA, GERMAIN, A., PERRON, F. et VAN COILLIE, R.

(1993c). Cheminements, écotoxicités et réglementations pour les HAP dans l'environnement. Liste des substance d'intérêt prioritaire : document de support n°3. 102 p.

EPA (1989). Protocols for Short Term Toxicity of Hazardous Wastes Sites : Eartworm Survival (*Eisenia foetida*). EPA Technical Report : EPA/600/3-88/029 (modifié).

EPA (1998a). EPA Series SW-846 Methods : 3550B Ultrasonic Extraction.

EPA (1998b). EPA Series SW-846 Methods : 3640A Gel-Permeation Cleanup.

EPA (1998c). EPA Series SW-846 Methods : 8270D Semivolatil Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrophotometry (GC/MS).

FORSYTH, J.V., TSAO, Y.M. et BLEAM, R.D. (1995). Bioremediation : When Is Augmentation Needed?. Bioaugmentation for Site Remediation, Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium - San Diego, R.E. Hinchee, J. Fredrickson, B.C. Alleman, Batelle Press, 3(3), 1-14.

GERSTL, Z., CHEN, Y., MINGELGRIN, U. et YARON B. (1989). Toxic Organic Chemical in Porous Media, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New-York, 343 p.

GIBBS, M.H., WICKER, L.F. et STEWART, A.J. (1996). A Method for Assessing Sublethal Effects of Contaminants in Soils to the Earthworm, *Eisenia foetida*. Environmental Toxicology and Chemistry, 15, 360-368.

HAEMMERLI, S.D., LEISOLA, M.S.A., SANGLARD, D. et FIECHTER, A. (1986). Oxidation of Benzo[a]pyrene by Extracellular Ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. The Journal of Biological Chemistry, 261, 6900-6903.

HAMILTON, H.R., KERR, D., GOUDEY, S., CHOLIAK, D. et WARD, J.G. (1994). Development of a Protocol for using Bioassays to Generate Site-Specific Remediation Criteria for Sour Gas Processing Plants. Symposium annuel sur la restauration des eaux souterraines et des sols contaminés - Centre des Congrès de Calgary (Alberta), 327-345.

HAMMEL, K.E., KALYANARAMAN, B. et KIRK, T.K. (1986). Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* Ligninase. The Journal of Biological Chemistry, 261, 16948-16952.

HAMMEL, K.E. (1989). Organopollutant Degradation by Ligninolytic Fungi. Enzyme Microbial Technology, 11, 776-777.

HAUGHT, R.C., NEOGY, R., VONDERHAAR, S.S., RADHA KRISHNAN, E..

SAFFERMAN, S.I. et RYAN, J. (1995). Land Treatment Alternatives for Bioremediating Wood Preserving Wastes. Hazardous Waste & Hazardous Materials, 12, 329-344.

HOLROYD, M.L. et CAUNT, P. (1995). Large-Scale Soil Bioremediation Using White-Rot Fungi. Bioaugmentation for Site Remediation, Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium - San Diego, R.E. Hinchee, J. Fredrickson, B.C. Alleman. Batelle Press, Batelle Press, 3(3), 181-187.

HUND, K. et TRAUNSPURGER, W. (1994). Ecotox - Evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH - Contaminated site. Chemosphere, 29, 37-55.

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER (IAF), PRODUITS SHELL CANADA LIMITÉE, ADS ENVIRONNEMENT (1996). Recherche et démonstration de traitement de sols contaminés par des hydrocarbures, présenté aux Ministère de l'environnement du Québec, Direction de la recherche et des technologies environnementales et Environnement Canada, 121 p.

ISO (1995). 11269-2 Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2 : Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants.

KEDDY, C.J., GREENE, J.C. et BONNELL, M.A. (1995). Review of Whole-Organism Bioassays : Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater Assessment in Canada. Ecotoxicology and Environmental Safety, 30, 221-251.

KIRK, T.K., SCHULTZ, E., CONNORS, W.J., LORENZ, L.F. et ZEIKUS, J.G. (1978). Influence of Culture Parameters on Lignin Metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Microbiology, 117, 277-285.

LAMAR, R.T. et DIETRICH, D.M. (1990). In Situ Depletion of Pentachlorophenol from Contaminated Soil by *Phanerochaete* spp. Applied and Environmental Microbiology, 56, 3093-3100.

LAMAR, R.T. et EVANS, J.W. (1993). Solid-Phase Treatment of a Pentachlorophenol-Contaminated Soil Using Lignin-Degrading Fungi. Environmental Science & Technology, 27, 2566-2571.

LESTAN, D., LESTAN, M., CHAPELLE, J.A. et LAMAR, R.T. (1996). Biological potential of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soil. Journal of Industrial Microbiology, 16, 286-294.

MA, W.-C., IMMERZEEL, J. et BODT, J. (1995). Earthworm and Food Interactions on Bioaccumulation and Disappearance in Soil of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons : Studies on Phenanthrene and Fluoranthene. Ecotoxicology and Environmental Safety, 32,

226-232.

MARWOOD, T.M., KNOKE, K., YAU, K., LEE, H., TREVORS, J.T., SUCHORSKI-TREMBLAY, A., FLEMMING, C.A., HODGE, V., LIU, D.L. et SEECH, A.G. (1998). Comparison of Toxicity Detected by Five Bioassays During Bioremediation of Diesel Fuel-Spiked Soils. Role of Bioassay in Bioremediation, J. Wiley & Sons, 117-126.

McFARLAND, M.J., QIU, X.J., SIMS, J.L., RANDOLPH, M.E. et SIMS, R.C. (1992). Remediation of Petroleum Impacted Soils in Fungal Compost Bioreactors. Water Science and Technology, 25, 197-206.

McFARLAND, M.J. et QIU, X.J. (1995). Removal of Benzo(a)pyrene in soil composting systems amended with the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Hazardous Materials, 42, 61-70.

MAY, R., SCHORÔDER, P. et SANDERMANN, H.JR. (1997). Ex-Situ Process for Treating PAH-Contaminated Soil with *Phanerochaete chrysosporium*. Environmental Science and Technology, 31, 2626-2633.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE DU QUÉBEC (MEF). (1998). Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés.

MEF (1995). 410-HYD. 1.0 Sols – Dosage des hydrocarbures pétroliers (C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>).

MORGAN, P. et WATKINSON, R.J. (1989). Hydrocarbon Degradation in Soils and methods for Soil biotreatment. CRC Critical Reviews in Biotechnology, 8, 305-331.

MORGAN, P., LEWIS, S.T. et WATKINSON, R.J. (1991). Comparison of Abilities of White-rot Fungi to Mineralize Selected Xenobiotic Compounds. Applied Microbiology and Biotechnology, 34, 693-696.

PICARD, P. (1995). Biodécoloration de teintures textiles. Mémoire de M.Sc.A., École Polytechnique de Montréal, Canada.

QIU, X. et McFARLAND, M.J. (1991). Bound Residue Formation in PAH Contaminated Soil Composting Using *Phanerochaete chrysosporium*. Hazardous Waste & Hazardous Materials, 8, 115-125.

RENEICKE, A.J. (1992). A Review of Ecotoxicological Test Methods Using Earthworms. Ecotoxicology of Earthworms, P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards, F. Heimbach, Intercept, 7-19.

RENOUX, A.Y., TYAGI, R.D., ROY, Y. et SAMSON, R. (1995). Ecotoxicological

Assessment of Bioremediation of a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil. Microbial Processes for Bioremediation, Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium – San Diego, R.E. Hinchee, F.J. Brockman, C.M. Vogel. Batelle Press, 3(8), 259-263.

RENOUX, A.Y. (1995). Évaluation de bioprocédés d'assainissement en phase solide/liquide par l'utilisation de biotests écotoxicologiques, Thèse de doctorat, Institut national de recherche, INRS-Eau.

SAMSON, R. (1996). Les sols contaminés. Technologies d'assainissement et prévention de la pollution, Télé-université, Sainte-Foy (Québec), 240-280.

SAUCIER, J.-Y. (1988). Les HAP : nouvelles vedettes dans le monde des contaminants. Milieu 36, 21-23.

SEECH A.G., MARVAN, I.J. et TREVORS, J.T. (1992). Soil Amendments for Bioremediation : Fundamental Interactions. In-Situ Bioremediation Symposium' 92, Niagara-on-the-Lake, S. Lesage, 194-198.

SHEPPARD, S.C., EVENDEN, W.G., ABOUD, S.A. et STEPHENSON, M. (1993). A Plant Life-Cycle Bioassay for Contaminated Soil, with Comparaison to Other Bioassays: Mercury and Zinc. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 25, 27-35.

SIMS, J.L., SIMS, R.C. et MATTHEWS, J.E. (1989). Bioremediation of Contaminated Surface Soil. EPA/600/9-89/073, 20 p.

SIMS, J.L., SIMS, R.C. et MATTHEWS, J.E. (1990). Approach to Bioremediation of Contaminated Soil. Hazardous Waste & Hazardous Materials, 7, 117-149.

SINGLETON, I. (1994). Microbial Metabolism of Xenobiotics : Fundamental and Applied Research. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 59, 9-23.

TUCKER, B., RADTKE, C., KWON, S.-I. et ANDERSON, A.J. (1995). Suppression of bioremediation by *Phanerochaete chrysosporium* by soil factors. Journal of Hazardous Materials, 41, 251-265.

WILSON, S.C. et JONES, K.C. (1993). Bioremediation of SOil Contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) : A Review. Environmental Pollution, 81, 229-249.

## **ANNEXE A : DESCRIPTION DES PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX**

---

### **A.1 Contenu en eau**

Le contenu en eau (%) des échantillons de sol est évalué de la façon suivante :

$$\text{contenu en eau} = [(PH - PC) - (PS - PC)] / (PH - PC) * 100$$

Le poids humide du sol (PH) a été déterminé en plaçant environ 5 grammes de sol dans une cupule en aluminium préalablement pesé (PC). Les échantillons ont ensuite été séchés à 105° C durant 24 heures. Avant de déterminer le poids sec des échantillons (PS), les cupules sont placées au dessicateur pendant 1 heure. Toutes les mesures ont été réalisées sur une balance analytique.

### **A.2 Capacité de rétention en eau**

Un filtre a été placé sur un entonnoir fixé à un support. Il a été immergé avec de l'eau distillée afin de l'humidifier et de l'assouplir. Environ 10 grammes de sol a ensuite été transféré sur le filtre et l'échantillon a été hydraté avec de l'eau distillée. Un couvercle a alors été placé sur l'entonnoir pour prévenir l'évaporation. Une période de 3 heures a été allouée afin de laisser s'égoutter l'eau par gravité. Environ 5 grammes des échantillons ont alors été transférés dans des cupules en aluminium préalablement pesés à la balance analytique (PH et PC). Les échantillons ont été séchés à 105° C durant 24 heures puis mis au dessicateur pendant 1 heure. Les échantillons ont été pesés rapidement (PS) afin d'obtenir le poids sec des échantillons. La capacité de rétention en eau (%) est évaluée de la façon suivante :

$$\text{capacité de rétention en eau (\%)} = (PH - PS) / (PS - PC) * 100$$



### **A.3 Mesure du pH d'un sol**

L'échantillon de sol est homogénéisé, asséché à l'air ambiant (24 heures) et tamisé ( $< 2$  mm). Il est ensuite séparé en fraction de 10 grammes (duplicat) et 10 ml d'eau distillée ( $\text{pH} = 7$ ) est ajouté à chaque fraction. L'homogénéisation est réalisée au vortex pendant 1 minute et 1 heure est allouée pour la sédimentation du sol. La mesure du pH est alors effectuée dans le surnageant (modele).

**ANNEXE B : COMPOSITION DES MILIEUX  
MINÉRAUX ET DES MILIEUX DE CULTURE**

---

### B.1 Composition du milieu minéral salin (MSM)

Le milieu minéral salin a été utilisé pour ajuster l'humidité lors des essais de biodégradation. Par cet ajout on assure la présence des nutriments nécessaires au fonctionnement du métabolisme microbien. La composition du MSM est la suivante :

Composés	Concentration (mM)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	6,4
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	12,99
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,33
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,39
$\text{NaNO}_3$	11,79
solution de métaux traces (1)	1 ml/L

Composés de la solution de métaux traces (1)	Concentration ( $\mu\text{M}$ )
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CuSO}_4$	1
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2

## B.2 Composition du milieu favorisant la croissance de *P. chrysosporium* (MFC)

Le milieu de culture est utilisé lors de l'inoculation du bran de scie pour favoriser la croissance de *P. chrysosporium*. La composition est basée sur celle utilisée par Kirk *et al.* (1978) et Picard (1995). Le milieu de métaux traces est préparé dix fois plus concentré.

Composés	Concentration (mM)
Glucose	56
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12
2,2-diméthylsuccinate	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g/L
hydrochlorure de thiamine	0,001 g/L
solution de métaux traces (2)	1 ml/L

Composés de la solution de métaux traces (2)	Concentration (g/L)
Fe(SO <sub>4</sub> )·7H <sub>2</sub> O	0.1
NaCl	1
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.082
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3
CoCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.153
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.5

### B.3 Composition des milieux de culture (section 6.1.7)

Milieu streptomycine <sup>1</sup>	Milieu Poly R streptomycine <sup>1</sup>
<b>Partie A</b> dans 960 ml d'eau distillée : 20 g d'extrait de malt 15 g de Bacto-Agar 0,03 g de benlate	<b>Partie A</b> dans 960 ml d'eau distillée : 15 g d'extrait de malt 15 g de Bacto-Agar 1 g de "yeast extract" 0,2 g de Poly R 0,03 g de benlate
<b>Partie B</b> dans 40 ml d'eau distillée : 0,55 g de streptomycine	<b>Partie B</b> dans 40 ml d'eau distillée : 0,55 g de streptomycine

Stérilisation de la partie A (20 min à 121° C).

Filtration de la partie B sur un filtre 0,45µm stérile.

Insérer la partie B dans la partie A après sa stérilisation.

1 : les pétris des deux milieux ont été fournis par *Biogénie inc.*

## **ANNEXE C : RÉSULTATS BRUTS**

---

### C.1 Résultats bruts du chapitre 4

Le tableau suivant présente les résultats bruts de la figure 4.5.

**Tableau C.1 : Concentrations résiduelles du phénanthrène contenu dans le sol enrichi artificiellement en présence ou en absence d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Concentration (mg/kg)		
	jour 0	jour 14	jour 54
MSM	100	24	1
MSM	95	47	1,2
MSM + inoculum	110	82	1,6
MSM + inoculum	106	63	1,2
témoin (MSM)	104	87	55
témoin (MSM + inoculum)	114	88	56

inoculum : *P. chrysosporium* sur support de bran de scie

## C.2 Résultats ayant mené au choix de la station d'échantillonnage (section 5.1.1)

Les tableaux C.2 et C.3 et la figure C.1 présentent les résultats de caractérisation obtenus pour les 3 zones du site étudiée. Suite à cette caractérisation la zone 4 a été sélectionnée.

**Tableau C.2 : Concentration en HAP, C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> et BPC dans le sol de 3 zones du site de la sablière Thouin (Assomption, sols échantillonnés en septembre 1997)**

Contaminants	Concentration (mg/kg)			Critère C <sup>(1)</sup> (mg/kg)
	zone 4	zone 9	zone 10	
<b>3 anneaux</b>				
Acénaphthylène	240	1 200	14	100
Acénaphène	130	940	3,5	100
Fluorène	220	2 000	5,2	100
Phénanthrène	390	5 900	9,1	50
Anthracène	110	930	6,2	100
<b>4 anneaux</b>				
Fluoranthène	84	850	2,8	100
Pyrène	170	1 800	6,5	100
Benzo[a]anthracène	40	460	nd	10
Chrysène	50	390	2,0	10
<b>5 anneaux</b>				
Benzo[b+j+k]fluoranthènes	27	250	2,5	10
Benzo[a]pyrène	28	260	2,1	10
Dibenzo[ah]anthracène	3,0	27	nd	10
<b>6 anneaux</b>				
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	5,3	63	nd	10
benzo[ghi]pérylène	9,3	82	1,3	10
dibenzo[a,i]pyrène	1,5	19	nd	10
dibenzo[a,h]pyrène	nd	7,6	nd	10
dibenzo[a,l]pyrène	2,0	31	nd	10
<b>HAP totaux</b>	1 555	25 110	67	--
<b>C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub></b>	30 000	140 000	920	3 500
<b>BPC totaux</b>	nd	nd	nd	10

(1) : MEF juin 1998

nd : non-déecté

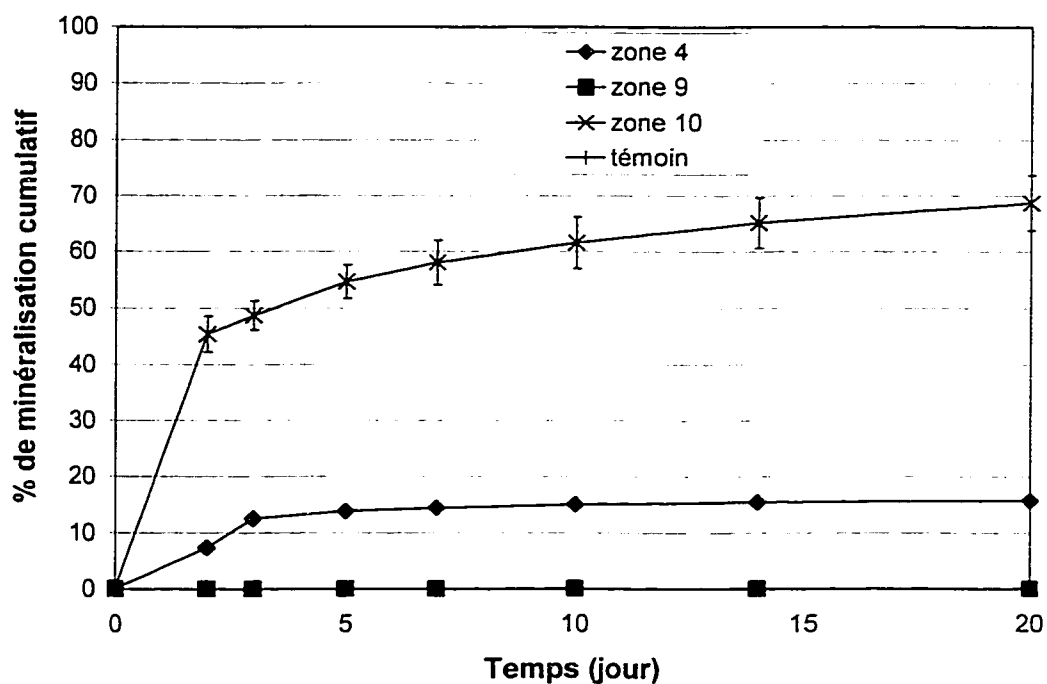


**Tableau C.3 : Concentration en métaux dans le sol de 3 zones du site de la sablière Thouin (Assomption, sols échantillonnés en septembre 1997)**

Métaux	Concentration (mg/kg)			Critère A <sup>(1)</sup>	Critère B <sup>(1)</sup>	Critère C <sup>(1)</sup>
	zone 4	zone 9	zone 10			
Mercure (Hg)	0.66	11	0,03	0,2	2	10
Arsenic (As)	nd	30	nd	10	30	50
Cadmium (Cd)	1,3	110	Nd	1,5	5	20
Chrome (Cr)	100	2 500	16	75	250	800
Cuivre (Cu)	42	700	7,6	50	100	500
Plomb (Pb)	240	6 300	nd	50	500	1 000
Magnésium (Mg)	2 400	6 600	2 300	--	--	--
Manganèse (Mn)	76	180	64	--	--	--
Nickel (Ni)	13	100	9,8	50	100	500
Zinc (Zn)	84	3 000	21	100	500	1 500

(1) : MEF mars 1996

nd : non-déecté



**Figure C.1 : Minéralisation de <sup>14</sup>C-phénanthrène dans le sol contaminé de 3 zones du site de la sablière Thouin. Les barres d'erreur représentent une unité de déviation standard d'une moyenne de trois répétition.**

### C.3 Résultats bruts du chapitre 5

**Tableau C.4 : Caractérisation chimique du sol suite à la campagne d'échantillonnage (Assomption, sol échantillonné en octobre 1997)**

Contaminants	Concentration <sup>(1)</sup> (mg/kg)		
	chaudière # 3	chaudière # 7	chaudière # 13
<b>3 anneaux</b>			
Acénaphthylène	91	72	95
Acénaphène	5,9	5,7	6,9
Fluorène	4,9	4,6	nd
Phénanthrène	2,2	3,7	3,4
Anthracène	16	19	16
<b>4 anneaux</b>			
Fluoranthène	50	42	52
Pyrène	200	180	210
Benzo[a]anthracène	30	27	36
Chrysène	60	60	67
<b>5 anneaux</b>			
Benzo[b+j+k]fluoranthènes	68	67	71
Benzo[a]pyrène	53	51	59
Dibenzo[ah]anthracène	9,9	9,9	10
<b>6 anneaux</b>			
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	15	16	16
benzo[ghi]pérylène	20	20	20
dibenzo[a,i]pyrène	3,6	4,1	4,2
dibenzo[a,h]pyrène	1,1	1,1	1,5
dibenzo[a,l]pyrène	5,7	4,7	5,6
<b>HAP totaux</b>	639	590	676
<b>C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub></b>	42 000	41 000	46 000

(1) : analyses effectuées avec 10 g de sol

nd : non détecté

Le tableau suivant présente les résultats bruts de la figure 5.10.

**Tableau C.5 : Pourcentage de récupération des ajouts dosés de D10-anthracène, D10-pyrène et D12-benzo(a)pyrène aux 22 échantillons composites**

Échantillons analysés	Récupération des ajouts dosés		
	<i>D10-anthracène</i>	<i>D10-pyrène</i>	<i>D12-benzo(a)pyrène</i>
1 - traitement 1	90	105	99
2 - traitement 1	94	112	104
3 - traitement 1	90	110	95
4 - traitement 1	89	110	97
5 - traitement 2	92	101	105
6 - traitement 2	94	117	98
7 - traitement 2	91	107	95
8 - traitement 2	90	111	100
9 - traitement 3	77	102	87
10 - traitement 3	86	111	99
11 - traitement 3	89	109	95
12 - traitement 3	95	113	102
13 - traitement 4	93	99	102
14 - traitement 4	92	106	97
15 - traitement 4	91	118	102
16 - traitement 4	94	99	98
17 - traitement 5	91	116	102
18 - traitement 5	84	102	104
19 - traitement 5	93	106	104
20 - traitement 5	92	107	102
21 - témoin abiotique	88	104	98
22 - témoin abiotique	93	103	95
moyenne de récupération	90	108	99
écart-type	4	5	4

Le tableau C.6 présente les résultats bruts utilisés pour la figure 5.11.

**Tableau C.6 : Pourcentage de mortalité du ver *Eisenia foetida* (14 jours) dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Mortalité après 7 jours (%)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	67	30	40	87
sol + inoculum + MSM	83	47	50	73
sol stérilisé + inoculum + MSM	100	-	100	100
sol stérilisé + inoculum + MSM	100	-	70	97
sol + bran de scie + MSM	80	37	60	57
sol + bran de scie + MSM	77	37	27	87
sol + MSM	83	40	60	77
sol + MSM	73	37	43	70
sol seul	100	73	83	70
sol seul	100	57	47	90

Le tableau suivant présente les résultats bruts de la figure 5.11.

**Tableau C.7 : Pourcentage de germination du cresson *Lepidium sativum* (4 jours) dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Germination après 4 jours (%)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	73	83	83	15
sol + inoculum + MSM	0	73	89	67
sol stérilisé + inoculum + MSM	33		50	3
sol stérilisé + inoculum + MSM	3		3	8
sol + bran de scie + MSM	53	88	78	72
sol + bran de scie + MSM	30	55	69	33
sol + MSM	75	43	8	70
sol + MSM	40	35	64	8
sol seul	3	53	19	35
sol seul	68	38	56	38

Le tableau suivant présente les résultats bruts de la figure 5.12.

**Tableau C.8 : Pourcentage d'émergence du cresson *Lepidium sativum* (16 jours) dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Germination après 4 jours (%)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	63	78	89	44
sol + inoculum + MSM	0	88	100	89
sol stérilisé + inoculum + MSM	28		56	56
sol stérilisé + inoculum + MSM	25		11	66
sol + bran de scie + MSM	48	88	86	95
sol + bran de scie + MSM	30	55	78	61
sol + MSM	48	63	11	92
sol + MSM	38	53	89	46
sol seul	8	55	33	73
sol seul	68	45	69	76

Le tableau suivant présente les résultats bruts de la figure 5.13.

**Tableau C.9 : Biomasse totale du cresson *Lepidium sativum* (16 jours) dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Biomasse totale (g)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	0,0084	0,0112	0,0147	0,0097
témoin	0,0206	0,0126	0,0180	0,0142
sol + inoculum + MSM	0	0,0086	0,0164	0,0191
témoin	0,0206	0,0126	0,0180	0,0128
sol stérilisé + inoculum + MSM	0,0066		0,0086	0,0113
témoin	0,0206		0,0180	0,0142
sol stérilisé + inoculum + MSM	0,0048		0,0020	0,0132
témoin	0,0206		0,0180	0,0128
sol + bran de scie + MSM	0,0081	0,0097	0,0126	0,0155
témoin	0,0206	0,0126	0,0180	0,0142
sol + bran de scie + MSM	0,0057	0,0089	0,0135	0,0109
témoin	0,0206	0,0126	0,0180	0,0128
sol + MSM	0,0070	0,0108	0,0017	0,0166
témoin	0,0206	0,0126	0,0180	0,0142
sol + MSM	0,0079	0,0073	0,0154	0,0117
témoin	0,0206	0,0126	0,0180	0,0142
sol seul	0,0017	0,0077	0,0049	0,0096
témoin	0,0206	0,0126	0,0180	0,0142
sol seul	0,0091	0,0059	0,0076	0,0114
témoin	0,0206	0,0126	0,0180	0,0128

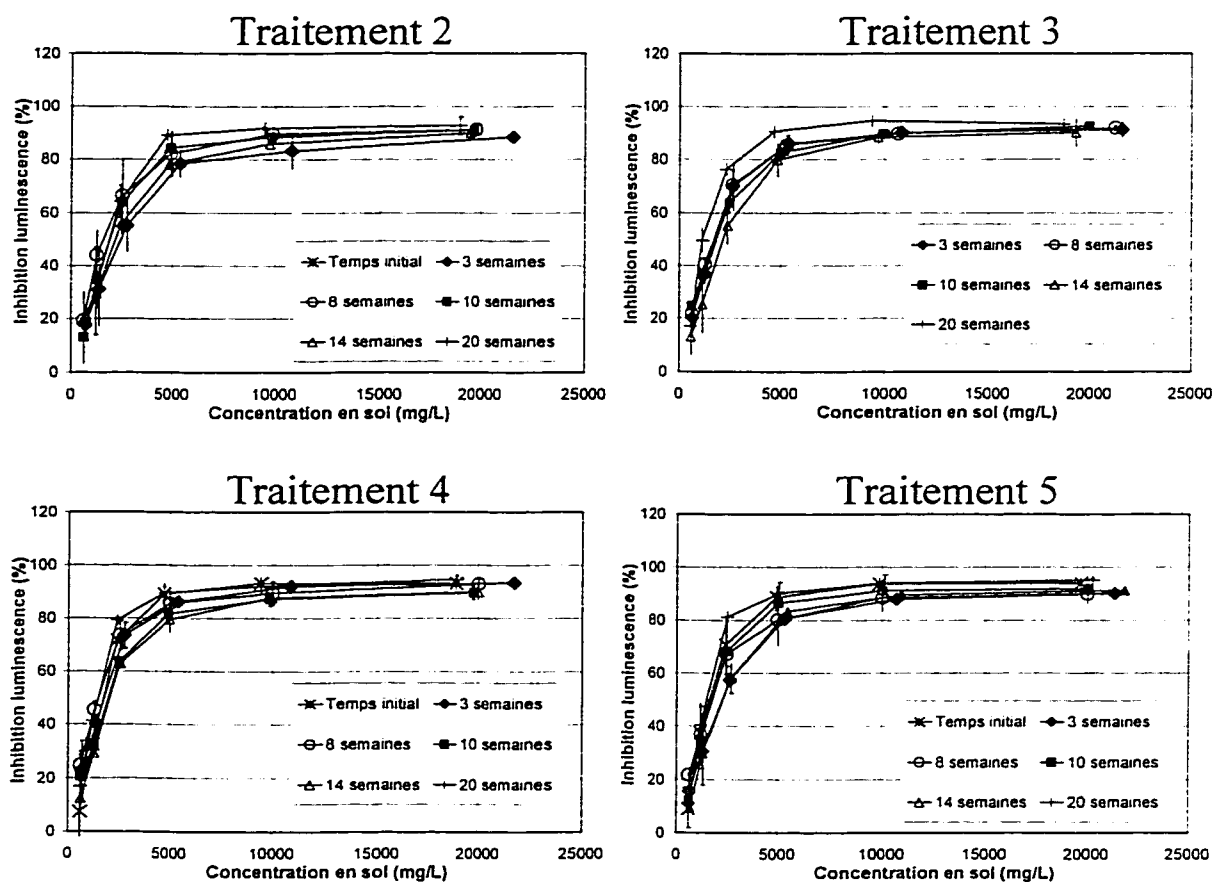
Le tableau suivant présente les résultats bruts utilisés pour la figure 5.14.

**Tableau C.10 : Biomasse individuelle du cresson *Lepidium sativum* (16 jours) dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Biomasse individuelle (g)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	0,0015	0,0015	0,0018	0,0024
témoin	0,0021	0,0013	0,0020	0,0015
sol + inoculum + MSM	0,0000	0,0010	0,0018	0,0023
témoin	0,0021	0,0013	0,0020	0,0013
sol stérilisé + inoculum + MSM	0,0018		0,0017	0,0021
témoin	0,0021		0,0020	0,0015
sol stérilisé + inoculum + MSM	0,0010		0,0015	0,0021
témoin	0,0021		0,0020	0,0013
sol + bran de scie + MSM	0,0019	0,0011	0,0016	0,0017
témoin	0,0021	0,0013	0,0020	0,0015
sol + bran de scie + MSM	0,0019	0,0016	0,0019	0,0021
témoin	0,0021	0,0013	0,0020	0,0013
sol + MSM	0,0015	0,0017	0,0008	0,0021
témoin	0,0021	0,0013	0,0020	0,0015
sol + MSM	0,0021	0,0014	0,0019	0,0029
témoin	0,0021	0,0013	0,0020	0,0015
sol seul	0,0006	0,0014	0,0016	0,0014
témoin	0,0021	0,0013	0,0020	0,0015
sol seul	0,0013	0,0013	0,0014	0,0016
témoin	0,0021	0,0013	0,0020	0,0013



La figure suivante présente les résultats Microtox pour les traitements 2, 3, 4 et 5.



**Figure C.2 :: Inhibition d'émission de lumière, mesurée par le Microtox® en phase solide, dans les sols contaminés provenant du traitement 2, 3, 4 et 5 pendant le biotraitement.**

Le tableau suivant présente les résultats bruts de la figure 5.17

**Tableau C.11 : Pourcentage de récupération des ajouts dosés de D10-anthracène, D10-pyrène et D12-benzo(a)pyrène utilisé dans les différents traitements**

Traitement	Concentration (mg/kg)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
<b>Traitement 1 : sol biaugmenté</b>				
<i>(P. chrysosporium</i> sur un support de bran de scie et MSM)				
D10-anthracène	91	92	55	87
D10-pyrène*	109	105	88	96
D12-benzo(a)pyrène*	99	91	73	108
<b>Traitement 2 : sol stérilisé biaugmenté</b>				
<i>(P. chrysosporium</i> sur un support de bran de scie et MSM)				
D10-anthracène	92	85	56	93
D10-pyrène*	109	111	98	110
D12-benzo(a)pyrène*	100	91	78	103
<b>Traitement 3 : sol biostimulé</b>				
(bran de scie et MSM)				
D10-anthracène	87	98	68	101
D10-pyrène*	109	108	84	110
D12-benzo(a)pyrène*	96	99	72	108
<b>Traitement 4 : sol biostimulé uniquement à l'aide de nutriment (MSM)</b>				
D10-anthracène	92	96	63	99
D10-pyrène*	106	108	98	103
D12-benzo(a)pyrène*	100	98	82	108
<b>Traitement 5 : sol sans traitement</b>				
D10-anthracène	90	91	60	85
D10-pyrène*	108	105	89	102
D12-benzo(a)pyrène*	103	94	63	103
<b>Témoin abiotique</b>				
D10-anthracène	91	--	--	96
D10-pyrène*	106	--	--	101
D12-benzo(a)pyrène*	97	--	--	103

Les tableaux suivants présentent les résultats bruts associés aux figures 5.18 à 5.23.

**Tableau C.12 : Concentrations résiduelles en acénaphthylène contenu dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Concentration (mg/kg)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	78	65	31	61
sol + inoculum + MSM	83	48	21	110
sol stérilisé + inoculum + MSM	84	52	33	65
sol stérilisé + inoculum + MSM	84	71	35	90
sol + bran de scie + MSM	87	68	30	110
sol + bran de scie + MSM	92	91	29	100
sol + MSM	92	44	38	120
sol + MSM	91	71	34	94
sol seul	97	80	40	68
sol seul	92	47	35	58
témoin abiotique	95			100

**Tableau C.13 : Concentrations résiduelles en fluoranthène contenu dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Concentration (mg/kg)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	41	18	5	4
sol + inoculum + MSM	38	19	4	9
sol stérilisé + inoculum + MSM	37	25	12	9
sol stérilisé + inoculum + MSM	37	23	13	9
sol + bran de scie + MSM	42	27	5	7
sol + bran de scie + MSM	43	28	3	6
sol + MSM	41	19	5	7
sol + MSM	44	22	5	6
sol seul	46	23	4	6
sol seul	42	24	6	7
témoin abiotique	41			45

**Tableau C.14 : Concentrations résiduelles en pyrène contenu dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Concentration (mg/kg)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	165	110	81	77
sol + inoculum + MSM	150	110	69	100
sol stérilisé + inoculum + MSM	155	120	110	120
sol stérilisé + inoculum + MSM	150	120	115	100
sol + bran de scie + MSM	158	150	91	110
sol + bran de scie + MSM	175	150	79	100
sol + MSM	170	110	110	96
sol + MSM	165	130	91	76
sol seul	175	130	70	135
sol seul	165	130	110	130
témoin abiotique	170			180

**Tableau C.15 : Concentrations résiduelles en benzo(a)anthracène contenu dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Concentration (mg/kg)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	27	21	10	9,4
sol + inoculum + MSM	26	18	7,7	18
sol stérilisé + inoculum + MSM	25	22	14	13
sol stérilisé + inoculum + MSM	27	21	19	15
sol + bran de scie + MSM	32	28	10	14
sol + bran de scie + MSM	30	28	8,7	13
sol + MSM	30	20	13	14
sol + MSM	31	23	10	12
sol seul	32	24	10	19
sol seul	30	22	14	17
témoin abiotique	29			29

**Tableau C.16 : Concentrations résiduelles en chrysène contenu dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Concentration (mg/kg)			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	50	36	25	35
sol + inoculum + MSM	48	35	23	48
sol stérilisé + inoculum + MSM	46	36	28	37
sol stérilisé + inoculum + MSM	48	36	35	41
sol + bran de scie + MSM	50	49	27	43
sol + bran de scie + MSM	53	46	22	41
sol + MSM	53	36	33	40
sol + MSM	54	40	30	39
sol seul	54	40	25	45
sol seul	51	42	33	47
témoin abiotique	51			56

**Tableau C.17 : Concentrations résiduelles en benzo(a)pyrène contenu dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Concentration (mg/kg)			
	semaine	semaine	semaine	semaine
	0	5	14	20
sol + inoculum + MSM	39	33	26	35
sol + inoculum + MSM	40	33	22,0	56
sol stérilisé + inoculum + MSM	39	33	29	38
sol stérilisé + inoculum + MSM	38	32	32	42
sol + bran de scie + MSM	40	45	29	47
sol + bran de scie + MSM	44	44	25	49
sol + MSM	43	34	34	45
sol + MSM	42	35	31	53
sol seul	44	37	22	40
sol seul	40	35	28	38
témoin abiotique	42			44



**Tableau C.18 : Concentrations résiduelles en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> contenu dans le sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	Concentration (mg/kg)	
	semaine 0	semaine 20
sol + inoculum + MSM	31 500	22 000
sol + inoculum + MSM	32 000	24 000
sol stérilisé + inoculum + MSM	29 000	22 000
sol stérilisé + inoculum + MSM	30 000	29 000
sol + bran de scie + MSM	35 000	26 000
sol + bran de scie + MSM	32 000	25 000
sol + MSM	36 000	26 000
sol + MSM	35 000	24 000
sol seul	31 000	27 000
sol seul	33 000	26 000
témoin abiotique	35 000	36 000

**Tableau C.19 : pH du sol contaminé suite au traitement biologique par l'ajout de MSM, de bran de scie et/ou d'un inoculum de *P. chrysosporium***

Traitement	pH			
	semaine 0	semaine 5	semaine 14	semaine 20
sol + inoculum + MSM	7,5	7,7	7,5	7,8
sol + inoculum + MSM	7,5	7,7	7,6	7,7
sol stérilisé + inoculum + MSM	nd	nd	7,3	7,7
sol stérilisé + inoculum + MSM	7,6	nd	7,4	7,6
sol + bran de scie + MSM	7,5	7,6	7,4	7,6
sol + bran de scie + MSM	nd	7,6	7,3	7,7
sol + MSM	7,3	7,6	7,3	7,7
sol + MSM	7,5	7,7	7,3	7,7
sol seul	7,7	7,7	7,8	7,5
sol seul	7,6	7,7	7,8	7,5

**Tableau C.19 : Capacité de rétention en eau du sol contaminé**

Traitement	Capacité de rétention en eau (%)
sol seul	65,7
sol amendé (bran de scie)	61,7

La figure suivante présente le pourcentage d'humidité mesuré dans les différents traitements. Pour chaque traitement les résultats des duplicats sont présentés. Suite à la mesure de l'humidité, cette dernière était ajustée à 25 % dans les traitements 1, 2, 3 et 4 et à 21 % dans le traitement 5, et ce si l'humidité mesurée était inférieure aux pourcentages prescrits.

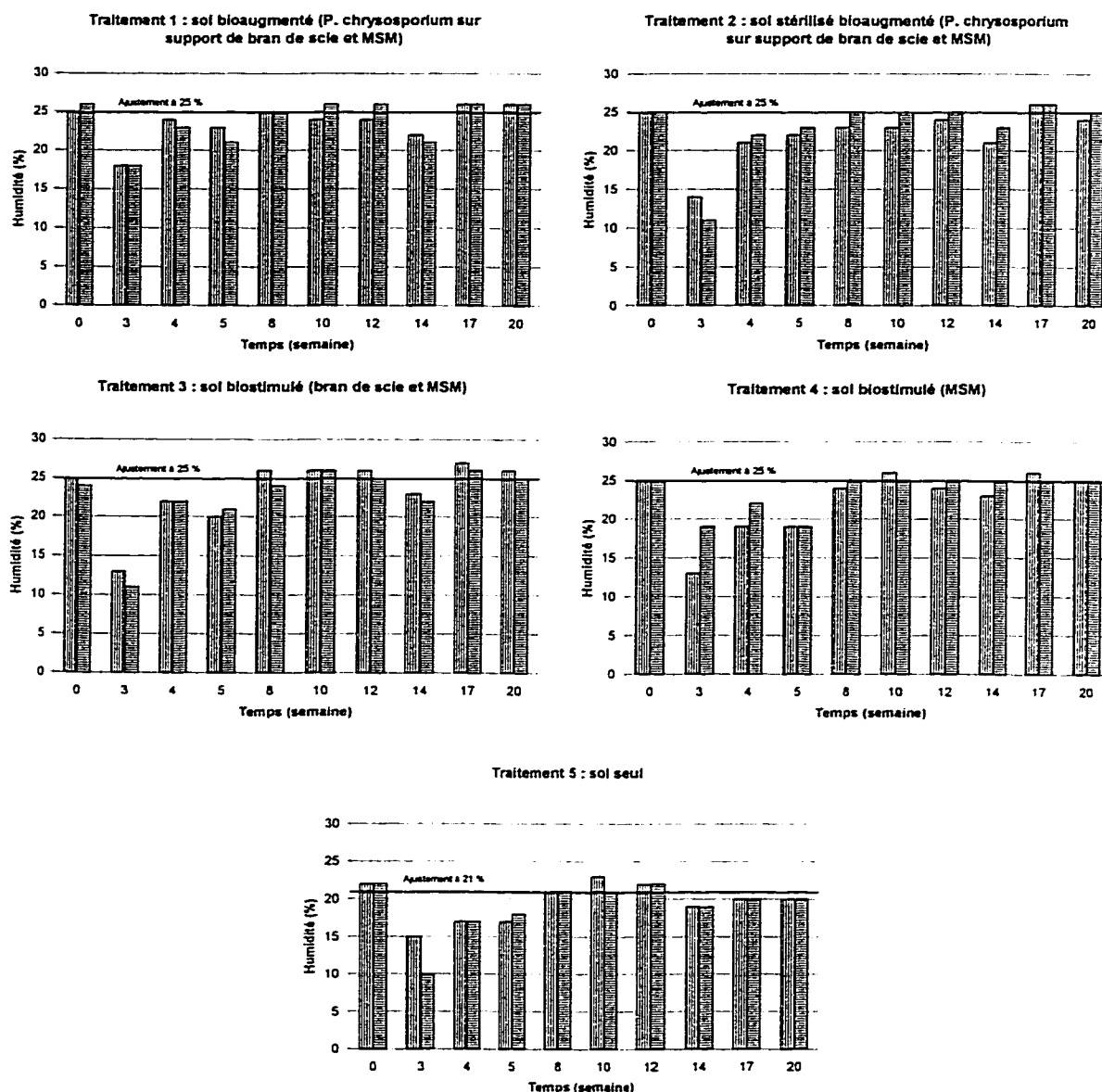


Figure C.3 :: Pourcentage d'humidité du sol contaminé dans les différents traitements après 0, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20.

La figure suivante présente les résultats obtenus de l'analyse de l'échantillon fortifié.

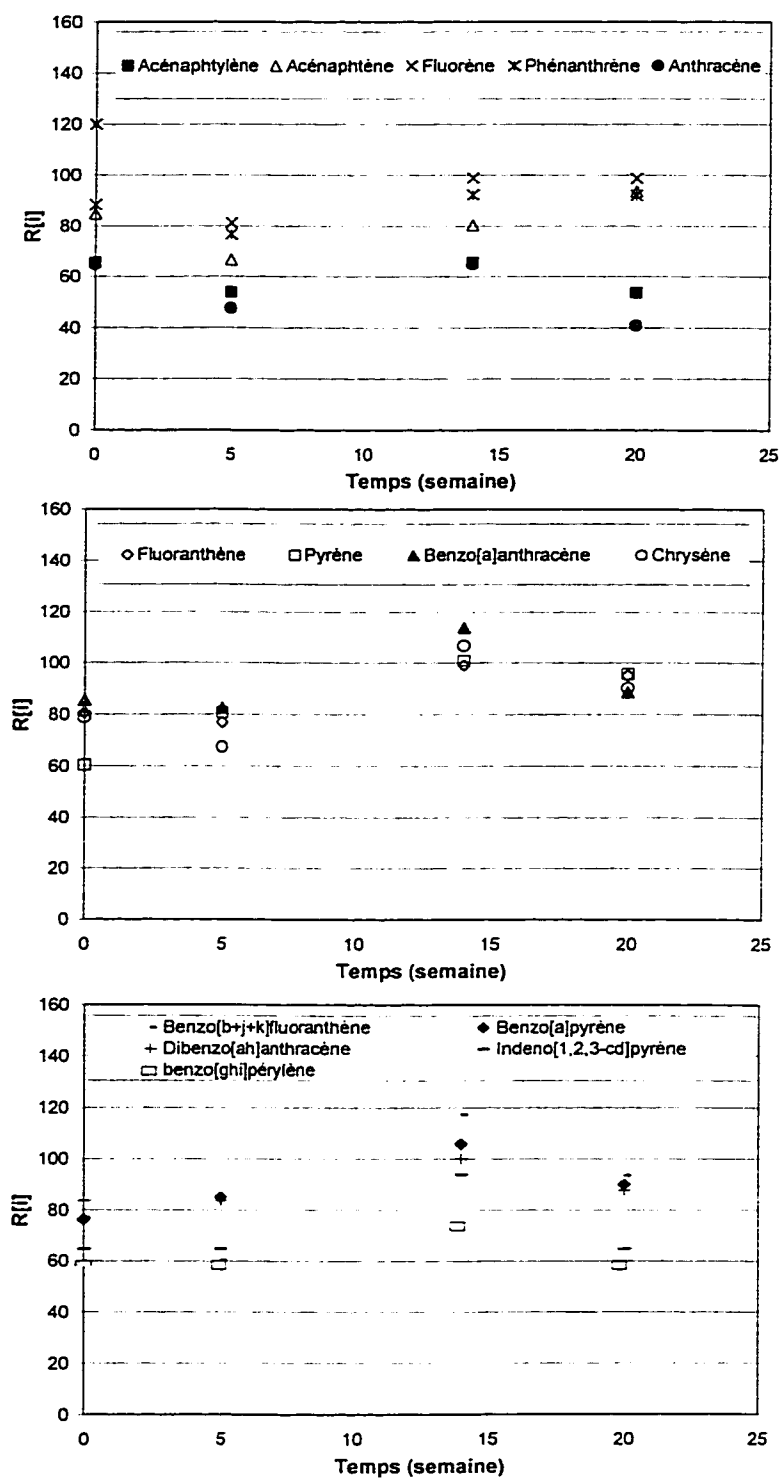
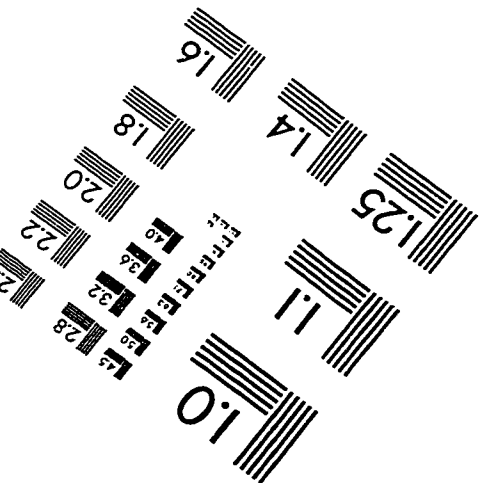
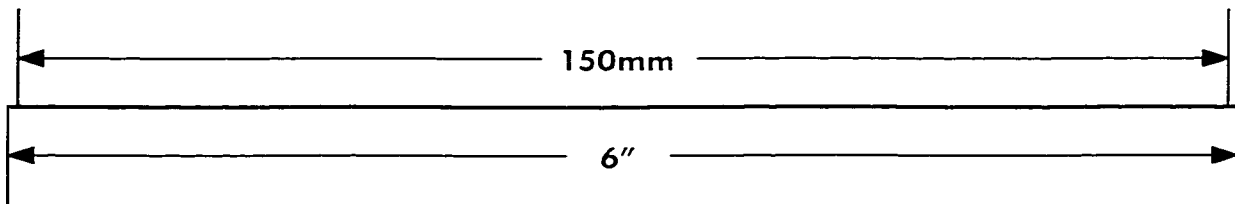
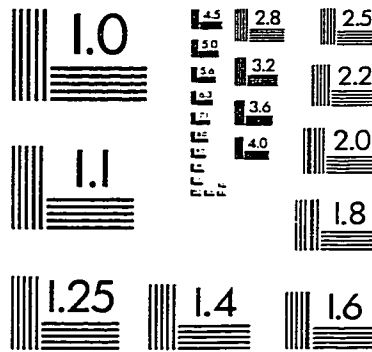
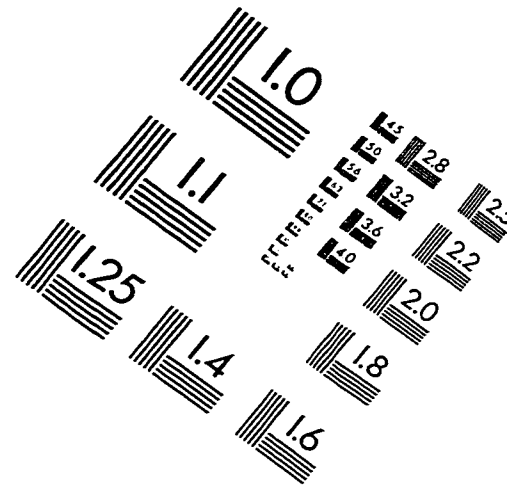
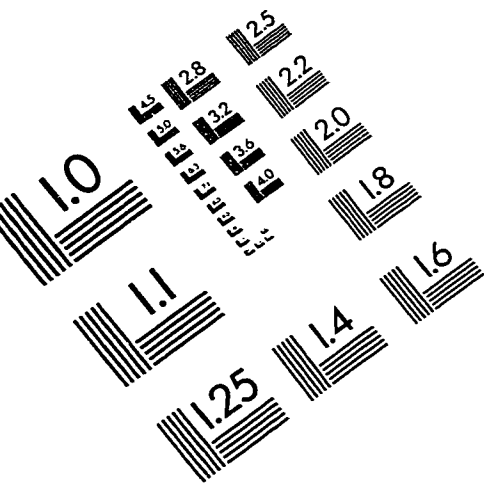


Figure C.4 : Pourcentage de récupération de 14 HAP dans l'échantillon fortifié.

# IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc  
1653 East Main Street  
Rochester, NY 14609 USA  
Phone: 716/482-0300  
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved

